

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke

der Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jan Helms

**Bedeutung des
„vasodilator-stimulated phosphoprotein“ (VASP)
für die Entwicklung des Hörvermögens von Säugetieren**

- eine experimentelle Studie an Mäusen -

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

René Hartensuer

aus Lauda-Königshofen

Würzburg, November 2004

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. S. Dazert

Koreferent: Prof. Dr. med. U. Walter

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2005

Der Promovend ist Arzt.

**Diese Arbeit ist in Dankbarkeit und Liebe
meinen Eltern gewidmet.**

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Physiologie des Hörens	1
1.2	Die Entwicklung und Innervation des Hörorgans.....	4
1.3	VASP.....	6
1.4	Lokalisation von VASP im Innenohr.....	11
1.5	Fragestellung	12
2	MATERIAL UND METHODE.....	13
2.1	Versuchstiere	13
2.2	Elektrophysiologische Untersuchung	13
2.2.1	Narkosetechnik.....	13
2.2.2	BERA	15
2.3	Zellkultur.....	19
2.3.1	Präparation der Mauscochlea.....	19
2.3.2	Spiralganglienzellkultur.....	21
2.3.3	Immunhistochemie	21
2.3.4	Histomorphometrie.....	22
2.3.5	Statistische Auswertung	23
3	ERGEBNISSE.....	24
3.1	Elektrophysiologische Untersuchung	24
3.1.1	Hörvermögen adulter Tiere	24
3.1.2	Hörbeginn bei Wildtypen und VASP-defizienten Tieren.....	24
3.2	Zellkultur.....	26
3.2.1	Neuritenwachstum auf Laminin	26
3.2.2	Neuritenwachstum unter NT-3 Stimulation.....	26
3.2.3	Neuritenwachstum auf Laminin und unter NT-3 Stimulation	26

4	DISKUSSION	28
4.1	Elektrophysiologische Untersuchung	28
4.1.1	Narkose.....	28
4.1.2	BERA	29
4.2	Zellkultur	31
4.3	Bedeutung von VASP für das Hörvermögen.....	32
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	40
6	LITERATURVERZEICHNIS	42

1 Einleitung

1.1 Physiologie des Hörens

Während des Hörvorganges werden im Säugetierinnenohr mechanische Schwingungen in elektrische Impulse umgesetzt. Zunächst wird der Schall durch das äußere Ohr (Ohrmuschel, Gehörgang) modifiziert und an das Trommelfell weitergeleitet. Dieses wird in Schwingung versetzt und bewegt seinerseits die Gehörknöchelchen im Mittelohr (Auris media). Im Mittelohr erfolgt eine Transformation der Schwingungen von der relativ großen Fläche des Trommelfells auf die deutlich kleinere Fläche des ovalen Fensters, das die Schallinformation an das Innenohr weiterleitet. Dies geschieht durch Übertragung der Trommelfellschwingungen auf den Hammer (Malleus), der dann den Amboss (Incus) und dieser wiederum den Steigbügel (Stapes) bewegt. Die Fußplatte des Steigbügels befindet sich im ovalen Fenster und überträgt die Schwingungen an die Innenohrflüssigkeit. Die unterschiedlichen Flächen von Trommelfell und ovalem Fenster sowie die durch die anatomischen Formen der Gehörknöchelchen bedingten Hebelwirkungen bewirken eine Impedanzanpassung der Schwingungen beim Übertritt der Schallwellen vom belüfteten Mittelohr in das mit Flüssigkeit gefüllte Innenohr (Pickles 1997).

Im Innenohr werden die mechano-akustischen Wellen in elektro-chemische Stimuli umgewandelt, die dann vom zentralen Nervensystem (ZNS) als Hörwahrnehmung weiterverarbeitet werden. Dies wird dadurch realisiert, dass die Schwingungen des ovalen Fensters im Perilymphkanal der Cochlea (Abbildung 1-1) als Wanderwelle fortgeleitet werden. Diese Wanderwelle wurde erstmals durch von Békésy (Békésy 1943; Békésy 1960) beschrieben und versetzt die Basilarmembran in Schwingungen, die je nach Frequenz ihre maximale Amplitude an einem bestimmten Ort der Gehörschnecke erreichen. Am Ort der Maximalamplitude wird nun die Tektorialmembran, welche sich über den Haarzellen befindet, relativ gegenüber diesen bewegt und bewirkt eine mechanische Abscherung der Stereozilien der äußeren Haarzellen. Diese Abscherung in Richtung der längsten Stereozilien, welche in die Tektorialmembran hinein ragen und sich am weitesten entfernt vom Modiolus befinden,

bewirkt eine Öffnung der Ionenkanäle und führt zur Depolarisation der Zellen. Hierbei strömen vor allem Kaliumionen aus dem positiv geladenen Endolymphraum (+80mV) in die negativ geladenen äußeren Haarzellen (-70mv). Die Depolarisation der Zelle hat eine aktive Längenänderung dieser zur Folge. Diese Formänderung erfolgt sehr schnell und ist reversibel. Als verantwortliches Protein hierfür wurde Prestin identifiziert (Zheng et al. 2000). Dieser Mechanismus, der als cochleärer Verstärker bekannt ist, kann die Rigidität der Cochlea verändern und somit die Wanderwelle amplifizieren. Das Ergebnis ist ein Hörorgan, das sensitiver ist und eine höhere Frequenzselektivität aufweist.

Am Ort der maximalen Amplitude erfolgt dann frequenzspezifisch eine Reizung der inneren Haarzellen. Auch hierbei führt eine Abscherung der Stereozilien zu einem Einstrom von vor allem Kaliumionen aus dem Endolymphraum (+80mV) in die negativ geladenen inneren Haarzellen (-45mV). Dies hat die Depolarisation der Haarzellen zur Folge und bewirkt somit einen Impuls, der an den Hörnerv (Spiralganglienzellen des N. vestibulocochlearis) und die akustischen Zentren weitergeleitet wird. Dieses Prinzip der Tonotopie setzt sich bis in das zentrale Nervensystem fort (Pickles 1997).

Fällt diese frequenzselektierende Funktion der Cochlea ganz oder teilweise aus, leiden die Betroffenen aufgrund einer Störung der Frequenzdiskriminierung vor allem an einem eingeschränkten Sprachverständnis. Die Cochlea ist somit sowohl in der Lage, eine Frequenzanalyse als auch eine Verstärkung von Schwingungen mit niedrigen Amplituden zu leisten.

Eine Prüfung des Hörvermögens lässt sich mit subjektiven und objektiven Verfahren durchführen. Für diese Arbeit wurde die Hirnstammaudiometrie (Brainstem Evoked Response Audiometrie = BERA oder Auditory Brainstem Response = ABR), eine objektive Messmethode verwendet. Hierbei werden so genannte auditorisch evozierte Potentiale an bestimmten Stellen über dem Hörnerv und dem Hirnstamm nach akustischer Reizung abgeleitet. Diese Technik wurde erstmals 1971 von Jewett und Williston beschrieben (Jewett and Williston 1971) und findet heute weite Verwendung in der klinischen Diagnostik von Hörstörungen. Wie beim EEG (Elektroenzephalogramm) werden bei dieser Technik Potentiale vieler verschiedener Zellen gleichzeitig registriert. Das angewandte Mittelungsverfahren („Averaging“) ermöglicht im Vergleich zum EEG die Aufzeichnung sehr kleiner Potentialänderungen.

Hierzu wird ein kurzer EEG-Abschnitt vielfach in einem Computer addiert. Dies ermöglicht eine Darstellung der reizabhängigen Potentialänderungen, wenn die Rahmenbedingungen konstant sind (Probst 2000).

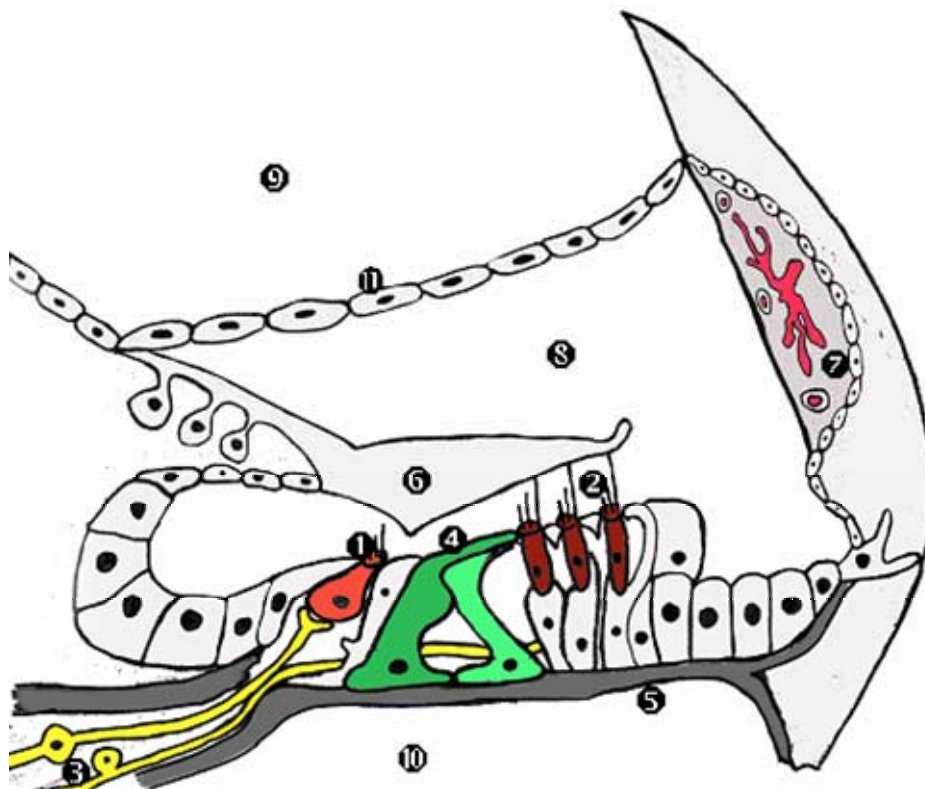


Abbildung 1-1: Schematische Abbildung eines Querschnitts durch den Ductus cochlearis der Cochlea.

1) Innere Haarzelle, 2) Äußere Haarzellen, 3) Spiralganglion, 4) Innere und Äußere Pillarzellen, 5) Basilarmembran, 6) Tektorialmembran, 7) Stria vascularis, 8) Ductus cochlearis (Endolymphe), 9) Scala vestibuli (Perilymphe), 10) Scala tympani (Perilymphe), 11) Reissner'sche Membran (Slepecky 1996)

1.2 Die Entwicklung und Innervation des Hörorgans

Das Verständnis der Entwicklung der Säugetiercochlea und deren Funktion sind nicht nur von klinisch-wissenschaftlichem Interesse. Die Innenohrschwerhörigkeit spielt in Deutschland sowohl aus gesundheitspolitischer als auch aus psychosozialer Sicht eine bedeutende Rolle. Zu den Ursachen der Innenohrschwerhörigkeit gehören sowohl kongenitale Erkrankungen als auch erworbene Schäden des Innenohres. Kausal liegt hauptsächlich eine Degeneration cochleärer Haar- und Spiralganglienzellen zu Grunde. Zurzeit ist es noch nicht möglich, eine Regeneration dieser cochleären Zellen herbeizuführen. Eine Möglichkeit der Hörrehabilitation bei untergegangenen Haarzellen (sensorische Taubheit) bietet die direkte Stimulation der noch vorhandenen Spiralganglienzellen durch eine in die Cochlea eingebrachte Elektrode (Cochlea-Implantat).

Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Innenohrbiologie sollen ein besseres Verständnis für die molekularen Mechanismen der Haarzell- und Neuritenentwicklung sowie der Funktionsaufnahme und Erhaltung der Cochlea vermitteln. Durch weitere Aufklärung der Bedeutung für die Hörentwicklung wichtiger Faktoren, wie z.B. VASP, könnte es gelingen, therapeutische Zugänge zu bisher nicht behandelbaren Hörerkrankungen zu finden.

Die Embryonalentwicklung des Innenohrs beginnt beim Nager etwa um den neunten Embryonaltag (E9) (Van de Water and Conley 1982). In der kaudalen Wand des sich ab E12 entwickelnden Ductus cochlearis entsteht das Cortische Organ. Dieses besteht um E13 aus einer sechslagigen Zellschicht. Ab E14 beginnt die Differenzierung der Stützzellen des Cortischen Organs, zu denen auch die sog. Pillarzellen gerechnet werden. Zwischen E18 und E19 beginnt die Formation des sensorischen Epithels in drei Reihen äußere Haarzellen und eine Reihe innere Haarzellen (Sher A.E. 1971). Das noch unreife Neuroepithel wird auch als Koelliker-Organ bezeichnet. Zu diesem Zeitpunkt sind die Neuriten der Spiralganglienzellen bereits bis in das Cortische Organ vorgewachsen (Rose et al. 1977). Die eigentliche Synapsenbildung mit den Haarzellen wird jedoch erst nach der Geburt hergestellt (Despres and Romand 1994). Unmittelbar nach der Geburt sind die Mäuse noch nicht in der Lage zu hören. Die cochleären

Strukturen entwickeln sich erst vollständig bis zum 12. Lebenstag. Zu diesem Zeitpunkt nimmt das Innenohr der Nager seine Funktion auf und erfährt seine endgültige Differenzierung. Zur gleichen Zeit wachsen die Neuriten der Spiralganglienzellen innerhalb des Cortischen Organs weiter vor und beginnen erst mit den inneren, später mit den äußeren Haarzellen, Synapsen zu bilden (Echteler 1992; Hafidi et al. 1990; Sobkowicz 1992).

In den letzten Jahren ist es gelungen, bestimmte Wachstumsfaktoren zu identifizieren, die permanent oder temporär während der Innenohrentwicklung exprimiert werden und das Wachstum der cochleären Zellen beeinflussen (Lin et al. 1989; Pirvola et al. 1994; Represa et al. 1990; Represa et al. 1991).

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten das Wachstumsverhalten von Haarzell- und Spiralganglienzellimplantaten in organotypischer Zellkultur, um die Bedeutung dieser Faktoren für die Entwicklung des Cortischen Organs näher aufzuklären. Besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang den Neurotrophinen (Lefebvre et al. 1992b; Lefebvre et al. 1991b; Lefebvre et al. 1991a; Lefebvre et al. 1992a; Staecker et al. 1995; Staecker et al. 1996; Van de Water and Conley 1982) und Mitgliedern der Fibroblastenwachstumsfaktoren (Aletsee et al. 2003; Dazert et al. 1998a; Dazert et al. 1998b; Low et al. 1996) zu, die in Innervationsvorgänge der Haarzellen involviert zu sein scheinen. Auch Proteine der Extrazellulärmatrix, wie z.B. Laminin, beeinflussen das Wachstumsverhalten cochleärer Zellen während dieser Entwicklungsphase (Aletsee et al. 2002b; Visconti and Hilfer 2002; Woolf et al. 1992).

Neurotrophin-3 (NT-3) wird während der Embryonal- und postnatalen Entwicklung im sensorischen Epithel des Säugetierinnenohres exprimiert (Maisonpierre et al. 1990). Es konnte gezeigt werden, dass NT-3 eine Rolle für das Überleben von cochleovestibulären Neuronen spielt (Ernfors et al. 1994b). Ebenso wird eine Beteiligung am Auswachsen der SG-Neuriten während der Entwicklung des Innenohres diskutiert (Schecterson and Bothwell 1994). Bei NT-3-defizienten Tieren kommt es zu einer signifikanten Reduktion der cochleären Neurone (Farinas et al. 1994). Dies lässt eine trophische Funktion von NT-3 für das Spiralganglion vermuten (Fritsch et al. 1997). Die intrazellulären Mechanismen, welche die beschriebenen Effekte von NT-3 vermitteln, sind für die SG-Neurone zum Teil aber noch nicht vollständig verstanden (Aletsee et al. 2001a; Aletsee et al. 2002a).

1.3 VASP

Das 46/50 kDa Protein „vasodilator-stimulated phosphoprotein“ (VASP) ist erstmals in Thrombozyten beschrieben worden, wo es einen bedeutenden Faktor für die Regulation der Formveränderung und Hemmung der Aggregation der Thrombozyten darstellt (Halbrügge and Walter 1989; Hauser et al. 1999). VASP zählt zur Familie der Ena („Drosophila enabled“)/VASP Proteine. Dieser gehören weiter das Drosophilaprotein Ena, dessen Pendant in Säugetieren Mena („mammalian-enabled“) und ein VASP ähnliches Protein namens EVL („Ena/VASP-like-protein“) an (Aszódi et al. 1999). Allen Familienmitgliedern sind die sog. Ena/VASP Domänen („Ena/VASP-homology“) EVH1 und EVH2 gemein (Gertler et al. 1996). Die N-terminal homologe Domäne (EVH1) besteht aus etwa 115 Aminosäuren (Halbrügge and Walter 1989) und stellt die bindungsaktive Region des Proteins dar (Abbildung 1-2). Sie bindet an prolinreiche Regionen und interagiert unter anderem mit Vinculin (Niebuhr et al. 1997; Reinhard et al. 1999) und Zyxin (Ball et al. 2000; Niebuhr et al. 1997). Beide Proteine sind für die Adhäsion von Zellen mitverantwortlich. Die EVH1 Domäne ist ebenfalls Bestandteil zahlreicher Proteine neuronaler Gewebe. Ihr wird eine besondere Rolle bei der Bildung von synaptischen Verbindungen und der Bildung von Gedächtnisleistungen beigemessen (Ball et al. 2002). An die EVH1 Domäne schließt sich eine prolinreiche Sequenz (PRR) an. Sie ermöglicht es, an die Abelson Protein Tyrokinase (ABL), an andere SH3 Domänen (Proteinbindungsdomäne „Scr-homology type 3“) (Ahern-Djamali et al. 1998; Gertler et al. 1996; Lambrechts et al. 2000) und an Profilin (Gertler et al. 1996; Lambrechts et al. 2000; Reinhard et al. 1995) zu binden. C-terminal befindet sich die EVH2 Region. Diese ist in die Bildung von Aktinfilamenten einbezogen und kann auch direkt an Aktinfilament (F-Aktin) binden (Bachmann et al. 1999) (Abbildung 1-3).

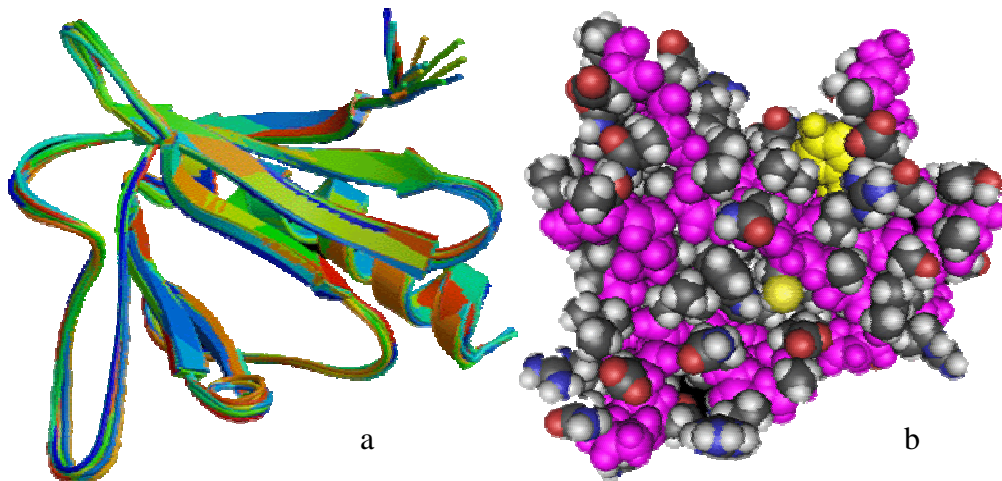


Abbildung 1-2: 3D-Rekonstruktion der EVH1 Domäne der Ena/VASP Homologie.

Die Abbildung zeigt das Bild einer 3-dimensionalen Rekonstruktion der EVH1 Domäne von VASP (“Solution Structure Of The Ena-Vasp Homology 1 (Evh1) Domain of Human Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein” (VASP)), (a) aus der Protein Datenbank, <http://www.rcsb.org/pdb/> (b) von NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, nach (Ball et al. 2000). Die Domäne ist in (b) pink eingefärbt.

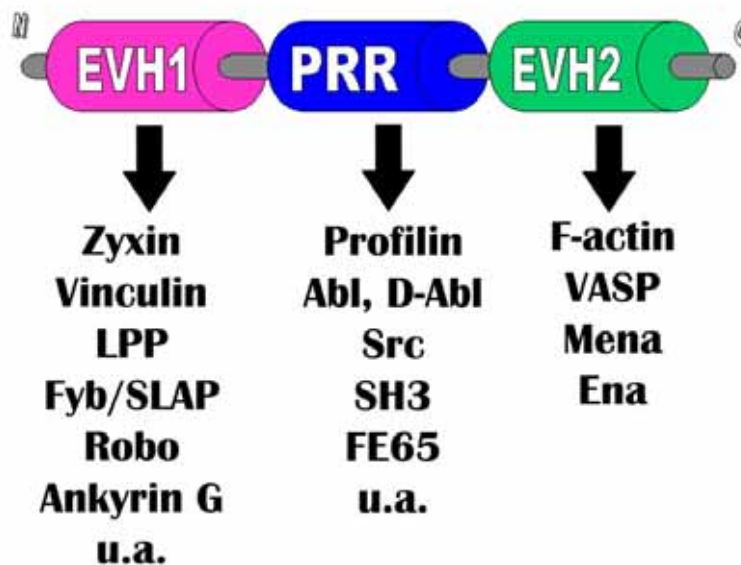


Abbildung 1-3: VASP-Domänen und ihre Bindungspartner.

Die N-terminale bindungsaktive EVH1-Domäne reagiert unter anderem mit Proteinen wie Vinculin, Zyxin und Robo.. Die prolinreiche Sequenz ermöglicht es dem VASP-Protein, mit der Abelson Protein Tyrokinase (ABL), mit SH3 Domänen (Proteinbindungsdomäne „Scr-homology type 3“) und Profilin zu interagieren. C-terminal befindet sich die EVH2 Region. Diese ist in die Bildung von Aktin –Filamenten einbezogen und kann auch direkt an Aktinfilament (F-Aktin) binden (Reinhard et al. 2001).

VASP spielt eine bedeutende Rolle bei der Fortbewegung von *Listeria monocytogenes*, dem Erreger der Listeriose. Diese Bakterien leben intrazellulär und bewegen sich dadurch fort, dass sie sich von der körpereigenen F-Aktin Polymerisation antreiben lassen. Dies ergibt den typischen Kometenschweif. Experimentelle Studien zeigen, dass Listerien ihre Beweglichkeit einbüßen, wenn man den von VASP vermittelten Mechanismus ausschaltet. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird die Möglichkeit eines erweiterten therapeutischen Spektrums in der Behandlung dieser Erkrankungen diskutiert (Pistor et al. 1995).

Eine mögliche Interaktion von VASP wird ebenfalls bei der Bewegung von Shigellen, den Erregern der Shigellose (Bakterienruhr), in Betracht gezogen. Auch der Vaccinia Virus, der früher zur Pockenschutzimpfung eingesetzt wurde, scheint VASP zur Interaktion mit dem Aktingerüst der Wirtszelle zu benutzen. Es ist allerdings nicht klar, ob VASP für die Mobilität des Virus essentiell ist (Bear et al. 2001).

Auch eukariote Zellen, scheinen Proteine der Ena/VASP-Familie zur Aktinformation zu benutzen. VASP wurde in einer großen Vielzahl von Zellen, z.B. Thrombozyten, Gefäßendothelzellen, glatter Muskelzellen in Gefäßen, Fibroblasten, Kardiomyozyten und andern (Draijer et al. 1995; Halbrügge and Walter 1989; Holt et al. 1998; Smolenski et al. 2000) nachgewiesen. Mäuse, welche Defekte in der Bildung von VASP haben oder nicht in der Lage sind, VASP zu bilden, zeigen Defekte in der cAMP- und cGMP vermittelten Hemmung der Plättchenaggregation (Aszódi et al. 1999; Hauser et al. 1999). Tiere, welche Mena, ein direkt verwandtes Protein von VASP nicht mehr synthetisieren konnten, waren nicht lebensfähig und zeigten starke neuronale Entwicklungsdefizite. Dies lässt vermuten, dass Mena essentiell für die neuronale Entwicklung ist (Lanier et al. 1999). Man geht davon aus, dass Ena/VASP-Proteine Aktinmonomere über eine Interaktion mit Profilin binden und damit die Filamentverlängerung katalysieren (Abbildung 1-4) (Laurent et al. 1999; Machesky and Insall 1999).

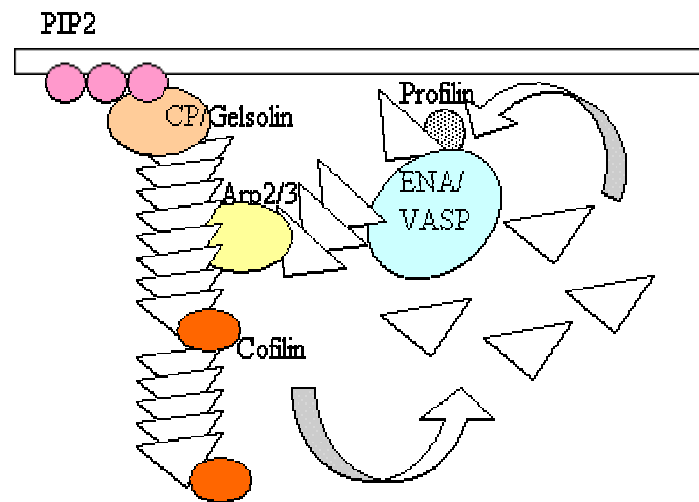


Abbildung 1-4: Ena/VASP-Proteine katalysieren die Verlängerung von Aktinfilamenten

Die Elongation von Aktinfilamenten wird durch sog. „capping“ Proteine (CP) und Gelsolin unter der Kontrolle von Membranphospholipiden (PIP₂) geregelt. Proteine der Ena/VASP-Familie katalysieren die Verlängerung, indem sie Aktinmonomere mit Hilfe des Arp 2/3-Komplexes (actin related protein) an das wachsende Filament anlagern (Machesky and Insall 1999).

VASP scheint eine entscheidende Rolle in der Organisation und Formation des Zytoskelettes einzunehmen. Wie beschrieben, wirkt dieses Protein regulatorisch in der Aktindynamik einer Zelle. Es wurde eine schnelle Phosphorylierung des VASP-Proteins beobachtet, wenn neutrophile Granulozyten beim Anheften an der Gefäßwand und im darauf folgenden Schritt das Gefäßsystem verlassen. Bei diesem Schritt macht die Zelle eine umfassende Formänderung durch. Man geht von aktiver Bewegung der Zellen in das umliegende Gewebe aus (Lawrence and Pryzwansky 2001). An Fibroblasten wurde ebenfalls eine aktive Bewegung in Abhängigkeit von VASP beobachtet. Fibroblasten, die ein VASP-Defizit aufwiesen, bewegten sich langsamer, jedoch anhaltender (Bear et al. 2002).

Mitgliedern der Ena/VASP-Familie wird ebenso eine Bedeutung bei der Anheftung von Zellen sowie beim Ausbilden von Zell-Zell-Kontakten zugeschrieben (Ahern-Djamali et al. 1998; Gertler et al. 1996; Lambrechts et al. 2000; Vasioukhin et al. 2000). Es wurde demonstriert, dass sie essentiell dafür sind, Adhärenskontakte auszubilden, um Membranen eines Epithelverbandes abzudichten. Für diesen Prozess ist eine gerichtete Aktinpolymerisation nötig (Vasioukhin et al. 2000).

Eine für die vorliegende Arbeit entscheidende Frage ist, inwiefern VASP einen Einfluss auf die Funktion der Cochlea, die Entwicklung des Innenohres und die damit verbundene Migration von SG-Neuronen und deren Neuriten hat. Es wird vermutet, dass Ena/VASP-Proteinen eine Schlüsselrolle bei der Positionierung von Neuronen zukommt (Goh et al. 2002). Ebenfalls wurde eine Bedeutung beim Auswachsen von Axonen beschrieben (Lanier et al. 1999).

1.4 Lokalisation von VASP im Innenohr

Die Expression von VASP und Zyxin, einem wichtigen Bindungspartner von VASP, wird im Innenohr unter anderem in den Kopf- und Fußplatten der Pillarzellen in Kolokalisation mit Aktin beschrieben (Abbildung 1-5) (Schick et al. 2003). Dies lässt eine dynamische Funktion dieser Zellen vermuten, denen bis dato strukturelle und metabolische Aufgaben zugeschrieben wurden (Cohen-Salmon et al. 1997; Tolomeo and Holley 1996). Ebenso wird ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Expression von VASP und Zyxin mit dem Hörbeginn beschrieben, was eine mögliche Bedeutung der Pillarzellen für die mechanische Funktion der Cochlea bedeuten könnte (Schick et al. 2003). Dem ausgeprägten Netzwerk aus Mikrotubuli, Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten in Pillar- und Deiter'schen Zellen wird ein Einwirken auf die durch Schallwellen induzierte Schwingung der Cochlea beigemessen. Eine Änderung in diesem Netzwerk, welche eine veränderte Steifigkeit dieser Zellen zur Folge hat, wird unter anderem als ein Mechanismus der Altersschwerhörigkeit diskutiert (Saha and Slepecky 2000). Die Pillarzellen galten bis zum Nachweis von VASP und Zyxin als eine unbewegliche Brücke zwischen inneren und äußeren Haarzellen, die nicht unwesentlich für die Rigidität der gesamten Cochlea zu sein schien (Nobili et al. 1998). Die Kolokalisation von VASP, Zyxin und Aktin in der Kopfplatte der äußeren Pillarzelle und in den Fußplatten beider Pillarzellen lässt die Spekulation über dynamische Prozesse dieser Zellen zu, in denen VASP eine Rolle zu spielen scheint. Die Expression von VASP wurde ebenso in Fibroblasten, Gefäßen und bestimmten Regionen des Spiralganglions nachgewiesen. Diese werden allerdings vom Autor der vaskulären Versorgung des Spiralganglions zugesprochen (Schick et al. 2003). Andere Arbeiten hingegen zeigen geringe, jedoch deutlich messbare Expression von VASP-Protein in neuronalem Gewebe (Gambaryan et al. 2001).

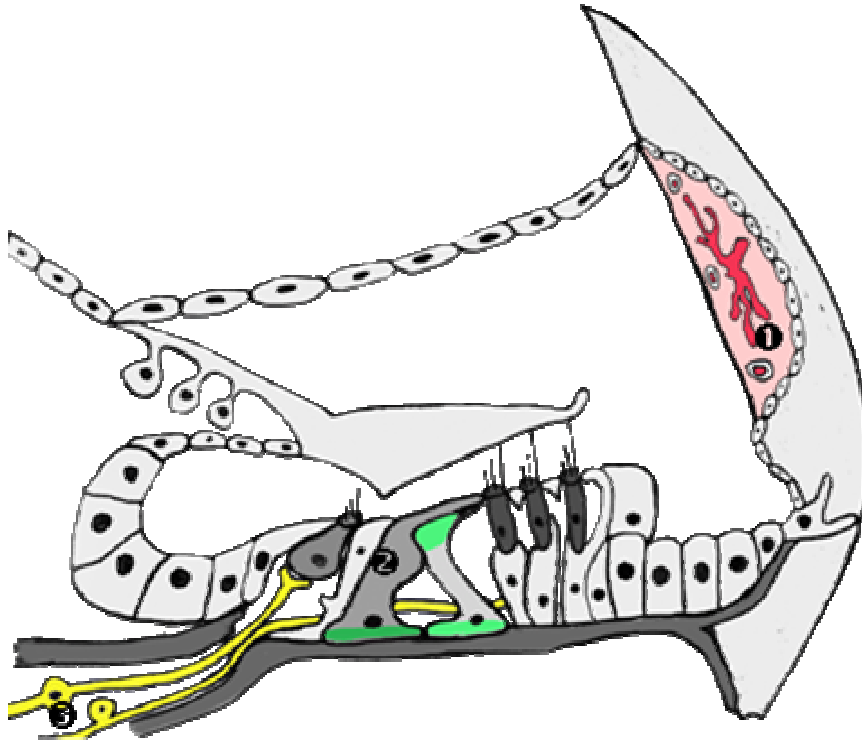


Abbildung 1-5: Nachweis von VASP in der Cochlea.

VASP wurde in Gefäßen der Stria vascularis (1), den Pillarzellen (2) und bestimmten Regionen des Spiralganglions (3) nachgewiesen (Schick et al. 2003).

1.5 Fragestellung

In dieser Arbeit werden die Entwicklung des Hörvermögens und das Neuritenwachstum von SG-Neuronen in Zellkultur von VASP-defizienten Mäusen untersucht. Hierbei ist von besonderem Interesse, ob die Tiere ein normales Hörvermögen entwickeln und ob sich diese Entwicklung von den Tieren der Kontrollgruppe unterscheidet. Gegenstand dieser Studie ist ebenso die Untersuchung der in Zellkultur gezüchteten SG-Explantate. Hierbei wird die Länge und die Anzahl der auswachsenden Nervenfortsätze von VASP(-/-)-Explantaten mit denen der Kontroll-explantate verglichen.

2 Material und Methode

2.1 Versuchstiere

Die folgenden Versuche wurden an VASP-defizienten (VASP(-/-)) Mäusen mit einem gemischten genetischen Hintergrund (129Sv und C57BL/6) sowie entsprechenden Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die VASP(-/-)-Tiere sind phenotypisch nicht von den Wildtypen unterscheidbar. Heterozygote und homozygote Tiere sind fertil und werfen unauffällige Nachkommen. Auch mikroskopisch lassen sich bis auf eine leichte Hyperplasie der Megakaryozyten im Knochenmark keine Unterschiede beschreiben (Hauser et al. 1999). Die Tiere wurden am Institut für klinische Biochemie der Universität Würzburg generiert und routinemäßig einem Infektionsscreening unterzogen. Alle Versuche wurden mit Genehmigung der zuständigen Behörde (Regierung Unterfranken) und entsprechend dem Tierschutzgesetz (§8) durchgeführt.

2.2 Elektrophysiologische Untersuchung

2.2.1 Narkosetechnik

Die Elektrophysiologischen Untersuchungen wurden in Inhalationsnarkose durchgeführt (Dazert et al. 2000). Verwendet wurde ein ventilloses, halboffenes System, bei dem eine Rückatmung durch den hohen Frischgasfluss verhindert wird (Abbildung 2-1). Das verwendete Inhalationsnarkotikum Isofluran (Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden) wurde durch einen handelsüblichen Verdampfer (Vapor 19.3 – Enflurane, Dräger AG, Lübeck) mit einem Lachgas/Sauerstoff-Gemisch (1l Lachgas + 1l Sauerstoff/min, entsprechend einem Flow von 2l/min) dargeboten. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 3 Vol. % Isofluran. Als Narkosemaske diente das Ansatzstück eines Absaugkatheters (Absaugkatheter gerade Typ „Ideal“ 10Ch, Braun Melsungen AG, Melsungen), das sich als passgenaues Maskenäquivalent zur Gaszuleitung eignete. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde die Gabe des Lachgas/Sauerstoff-Gemischs beibehalten und die Isoflurandosis auf 1-1,5 Vol. % reduziert. Die Narkosetiefe konnte durch die Änderung der Isoflurandosis so gesteuert

werden, dass die Tiere bei einer regelmäßigen Spontanatmung schmerzfrei waren. Die Ausleitung erfolgte bei alleiniger Sauerstoffgabe (2l/min) bis zum Erwachen der Tiere.



Abbildung 2-1: Versuchsaufbau mit Narkoseeinheit und BERA Messvorrichtung.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden in Inhalationsnarkose durchgeführt. Die Abbildung zeigt den Isofluran-Verdampfer des ventillosten, halboffenen Systems, das Ansatzstück eines Absaugkatheters, das sich als passgenaues Maskenäquivalent zur Gaszuleitung eignete, den Lautsprecher, die Elektroden, eine narkotisierte Maus und den BERA-Messcomputer.

2.2.2 BERA

Die elektrophysiologische Untersuchung des Hörvermögens erfolgte durch Ableitung von akustisch evozierten Potentialen. Für die Messungen wurde eine ERA Q/S-02 (Westra, Wertingen, Deutschland) verwendet, die auch in der klinisch-audiologischen Diagnostik der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke der Universität Würzburg eingesetzt wird. Als akustische Stimuli dienten alternierend angebotene Klicks von 100 μ s Dauer mit einer Repetitionsrate von 20/s und einer Intensität von 120dB SPL. Die Aufzeichnungen erfolgten bei adulten und neugeborenen Tieren zwischen dem 8. und 18. postnatalen Tag. Der akustische Stimulus ließ sich über einen magnetisch abgeschirmten Lautsprecher BF-66-214 (Westra, Wertingen, Deutschland) applizieren, der 5cm über dem Kopf des Nagers angebracht wurde. Die Potentiale konnten über subkutane Nadelelektroden abgeleitet werden. Die Pluselektrode (rot) wurde auf der Kopfmittle, die Minuselektrode (blau) hinter den Pinnae und die Erdungselektrode (gelb) am linken Hinterlauf platziert (Abbildung 2-2). Vor dem Anschluss der Elektroden an den Vorverstärker wurden deren Übergangswiderstände kontrolliert (<5k Ω) (Dazert et al. 2000). Die gemessenen Signale wurden 20.000fach verstärkt, gefiltert (untere Grenzfrequenz 100Hz, obere Grenzfrequenz 2.000Hz), analog/digital gewandelt und in einem 20ms-Fenster nach Reizbeginn auf dem Bildschirm abgebildet (Abbildung 2-3 und 2-4).

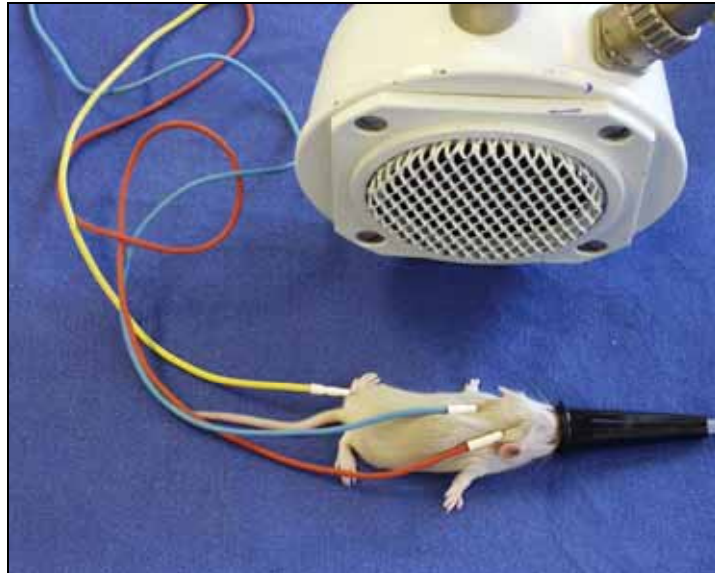


Abbildung 2-2: Versuchsanordnung der electrophysiologischen Messungen des Hörvermögens von Mäusen.

Die Abbildung zeigt die mit Isofluran narkotisierte Maus, das Anschlussstück eines Absaugkatheters, das als Narkosemaske fungiert, den 5cm vom Kopf des Nagers entfernten Lautsprecher und die subkutanen Nadelelektroden. Die Plus Elektrode (rot) wurde auf der Kopfmittle, die Minus Elektrode (blau) hinter den Pinnae und die Erdungselektrode (gelb) am linken Hinterlauf platziert.

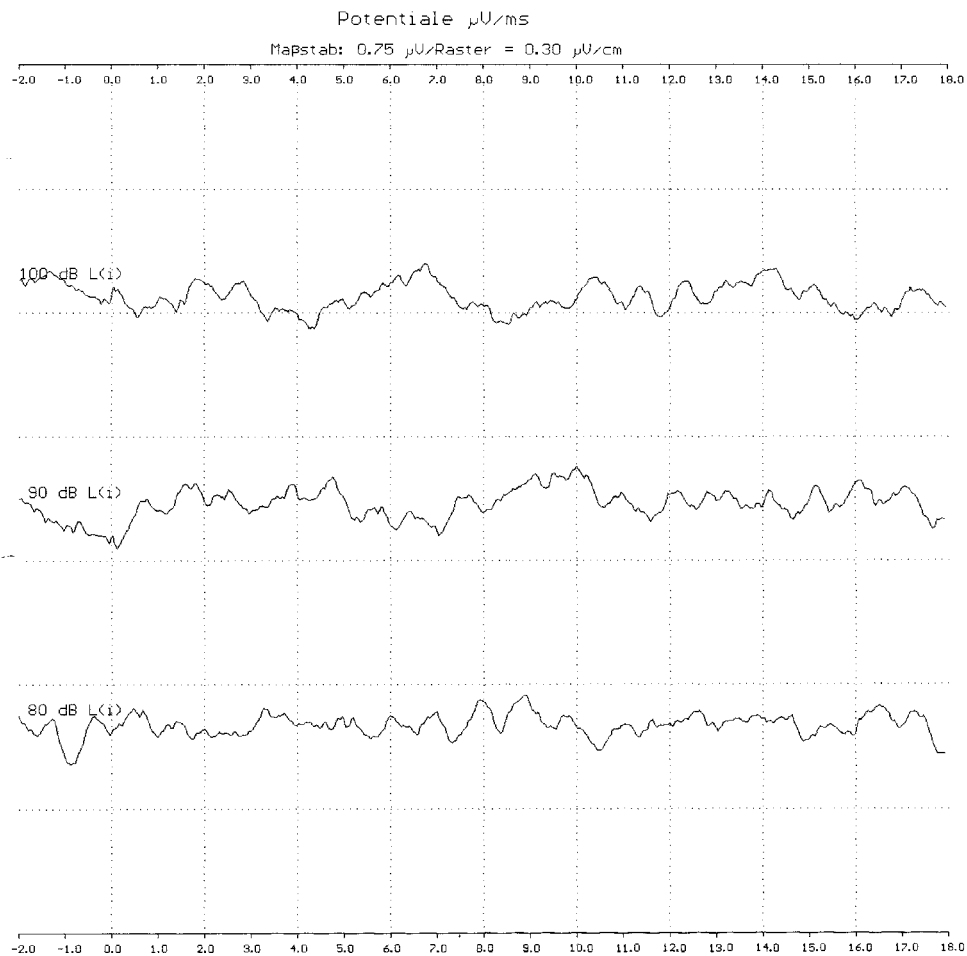


Abbildung 2-3: Elektrophysiologische Messungen einer noch nicht hörenden Maus.

Die Abbildung zeigt die graphische Darstellung der elektrophysiologischen Ableitungen bei 100 bis 80 dB SPL. Keine der Kurven zeigt das charakteristische Bild der Stimulation des Hörnerven und der Hörbahn.

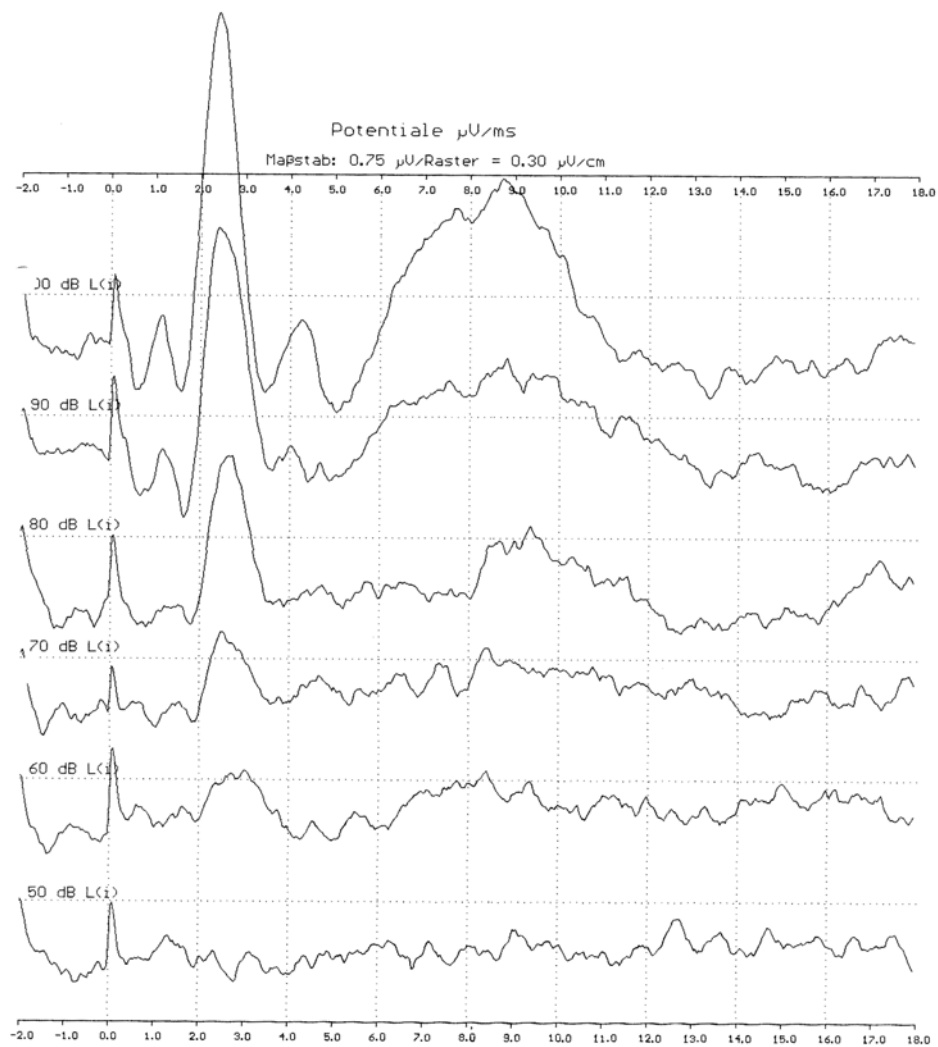


Abbildung 2-4: Elektrophysiologische Messungen einer bis 60 dB SPL hörenden Maus.

Die Abbildung zeigt die graphische Darstellung der elektrophysiologischen Ableitungen bei 100 bis 50 dB SPL. Die Kurven zeigen das charakteristische Bild der Stimulation des Hörnerven und der Hörbahn, das sich erst unter 60 dB SPL verliert. Die Hörschwelle dieser Maus liegt also bei 60 dB SPL.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Präparation der Mauscochlea

Die in dieser Arbeit dargestellten Experimente in organotypischer Zellkultur wurden an explantierten Spiralganglienzellen 5-6 Tage alter Mäuse (siehe oben) durchgeführt. Die Mikropräparation der Cochlea erfolgte modifiziert nach den Beschreibungen von Van De Water und Ruben (Van de Water and Ruben 1974; Van de Water and Ruben 1971). Um eine Kontamination der Explantate bzw. der folgenden Zellkultur, vor allem mit Pilzen zu vermeiden, musste vor Beginn der Präparation das Präparationsgebiet mit Alkohol gereinigt, die verwendeten Instrumente desinfiziert und jeweils neue Instrumente für die Haut- bzw. Cochleapräparation verwendet werden.

Die Tiere wurden vor dem Eingriff mit einer Mischung (Ketamin 12,5 mg/ml, Rompum 1,26 mg/ml, Acepromecin 0,25 mg/ml) 0,4ml pro 100g Körpergewicht intraperitoneal anästhesiert, dekapitiert und die Schädel entlang der Mittellinie longitudinal eröffnet. Nach der Entfernung des Gehirngewebes wurde mit der weiteren Dissektion der Schädelhälften unter dem Operationsmikroskop (OPMI 1, Carl Zeiss, Deutschland) in einer Petrischale mit sterilem PBS (phosphate buffered saline) fortgeföhren. Zunächst musste der Sinus petrosus inferior aufgesucht werden, der als „U-förmiges“ Venensystem in der Konkavität der Schädelhälften das Felsenbein umgibt. Das Felsenbein wurde vom restlichen Schädel getrennt und die Cochlea umgebende Kapsel entfernt. Nach Entfernung dieser konnte die membranöse Cochlea in eine weitere Petrischale übertragen werden (Abbildung 2-5). Nun ließen sich Stria vascularis, Reissner'sche Membran und das Cortische Organ mit einer feinen Pinzette abtragen und das Spiralganglion exponieren. Dieses wurde vom Modiolus abgezogen und mit einem Skalpell in etwa 6-8 gleich große Anteile geschnitten (Abbildung 2-6). Diese Technik war vom Alter der Tiere abhängig, da mit zunehmendem Alter die Konsistenz der Cochleakapsel und die Adhärenz der unterschiedlichen Gewebe zunahmen. Bei den verwendeten Tieren im Alter von 5-6 Tagen war die Präparation noch gut durchführbar.



Abbildung 2-5: Membranöse Cochlea.

Nach Entfernung der knöchernen Cochleakapsel lässt sich die häutige Cochlea darstellen. In einem nächsten Schritt kann Stria vascularis, Reissner'sche Membran und das Cortische Organ abtragen und das Spiralganglion exponiert werden.

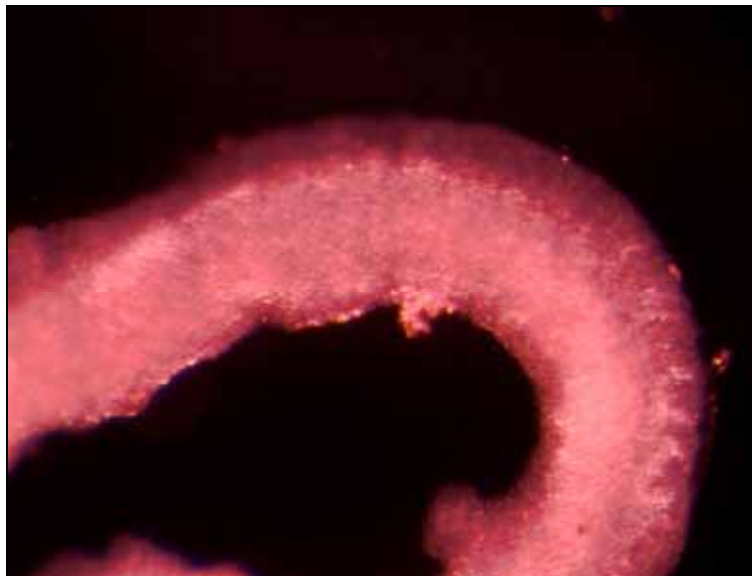


Abbildung 2-6: Vom Modiolus abgelöstes Spiralganglion.

Das vom Modiolus abgezogene Spiralganglion wurde in etwa 6-8 gleich große Anteile geschnitten. Die so gewonnenen Explantate ließen sich zwischen den Branchen einer Pinzette in einem PBS-Tropfen in die Kulturschalen übertragen und wurden in deren Zentrum platziert.

2.3.2 Spiralganglienzellkultur

Die Zellkultur der entnommenen SG-Explantate wurde modifiziert nach Lefebvre et al. (Lefebvre et al. 1992b; Lefebvre et al. 1991a) durchgeführt. Die vor dem Beginn der Experimente zur besseren Adhäsion des neuralen Gewebes mit Poly-D-Lysin (0,1mg/ml) in D-PBS beschichteten Kulturplatten wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und mit D-PBS gespült. Bei einem Teil der Platten wurde zusätzlich Laminin (0,01mg/ml) in D-PBS zugegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Das Medium (DMEM) wurde mit N2-Supplement (1%), Insulin (10 µg/ml), Glucose 30% (6,15 mg/ml) und Penicillin (30 U/ml) angereichert und mit HEPES-Puffer zu einer Endkonzentration von 10mM versetzt. Bei einem Teil der Präparate wurde NT-3 (25ng/ml) zugegeben. Die verwendeten Kulturplatten (Falcon®, Multiwell™ 48 well, Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ USA) wurden mit 75µl Medium pro Zellkulturschale gefüllt.

Die Explantate ließen sich zwischen den Branchen einer Pinzette in einem PBS-Tropfen in die Schalen übertragen und wurden in deren Zentrum platziert, da dort der Spiegel des Flüssigkeitsmeniskus am niedrigsten war. Das Gewebe wurde bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95% für 5 Tage inkubiert. Des Weiteren musste darauf geachtet werden, dass die Kulturschalen nicht austrockneten.

2.3.3 Immunhistochemie

Nach 5 Tagen wurden die Präparate mit einem Aceton-Ethanolgemisch (1:1) für 15 Minuten fixiert und dann einmal mit D-PBS gewaschen. Es erfolgte eine Inkubation mit Pferdeserum, um eine unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden. Der Nachweis des 200 kDa Neurofilamentproteins in den Spiralganglienneuronen gelang durch den monoklonalen Antikörper RT97 (Boehringer Mannheim). Die Präparate wurden mit dem RT97 Antikörper (1:500 verdünnt in Pferdeserum) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Als zweiter Antikörper diente ein biotinylierter Antikörper (Vectastain® Elite ABC KIT (Mouse IgG), Vector Laboratories, Inc.). Die Inkubation der Präparate mit diesem dauerte, nach einmaliger Spülung mit D-PBS, 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einer weiteren Inkubation mit einem Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat für 30 Minuten bei Raumtemperatur und dem einmaligen Spülen mit D-PBS, konnte die

Färbung mit Diaminobenzidin (DAB Substrate KIT for Peroxidase, Vector Laboratories, Inc.) durchgeführt werden (Abbildung 2-7).

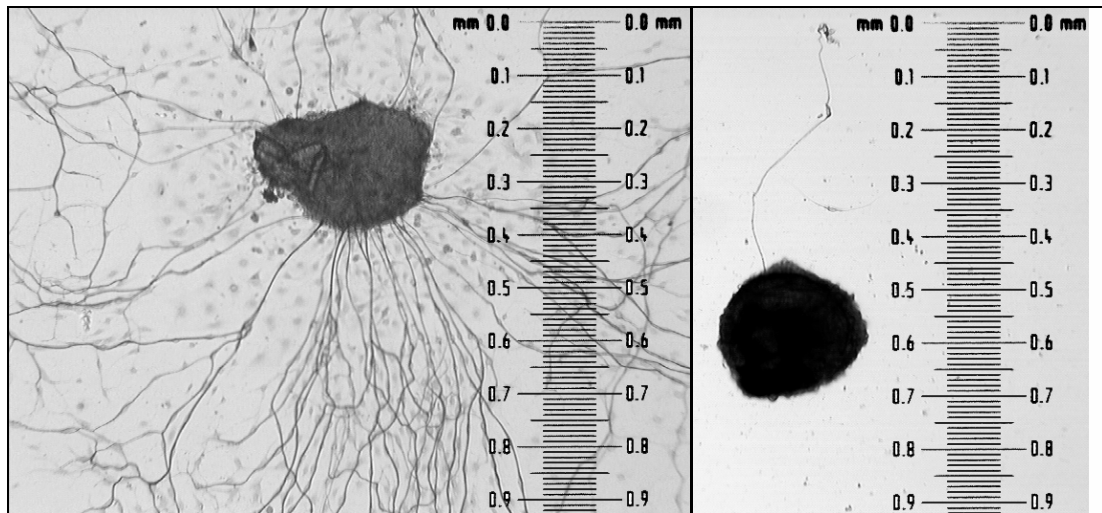


Abbildung 2-7: Spiralganglienzell-explantate mit Maßstab.

Links sind viele, rechts nur ein Neurit ausgewachsen. Die Angaben sind in Millimeter.

2.3.4 Histomorphometrie

Das Wachstumsverhalten der SG-Neuriten in Zellkultur wurde im Hinblick auf die Länge und die Anzahl der auswachsenden Nervenfortsätze beurteilt. Die mit einem Antikörper gegen Neurofilament markierten Kulturen wurden mikroskopiert (Wilovert Wills, Wetzlar) und digital fotografiert (DXC 930P, Sony, Japan), auf einen Rechner übertragen (pci Graber 4, Phytect Messtechnik, Mainz) und mit einem in der Arbeitsgruppe entwickelten Programm vermessen. Hierzu wurde ein Maßstab mikroskopiert, fotografiert und das PC-Programm damit geeicht. Gemessen wurde die lineare Strecke zwischen dem Explantat und dem Wachstumskegel („growth cone“) der Neuriten. Dazu mussten die vom Explantat auswachsenden Neuriten mit dem Computer nachgezeichnet und vermessen werden (Mlynski et al. 2002).

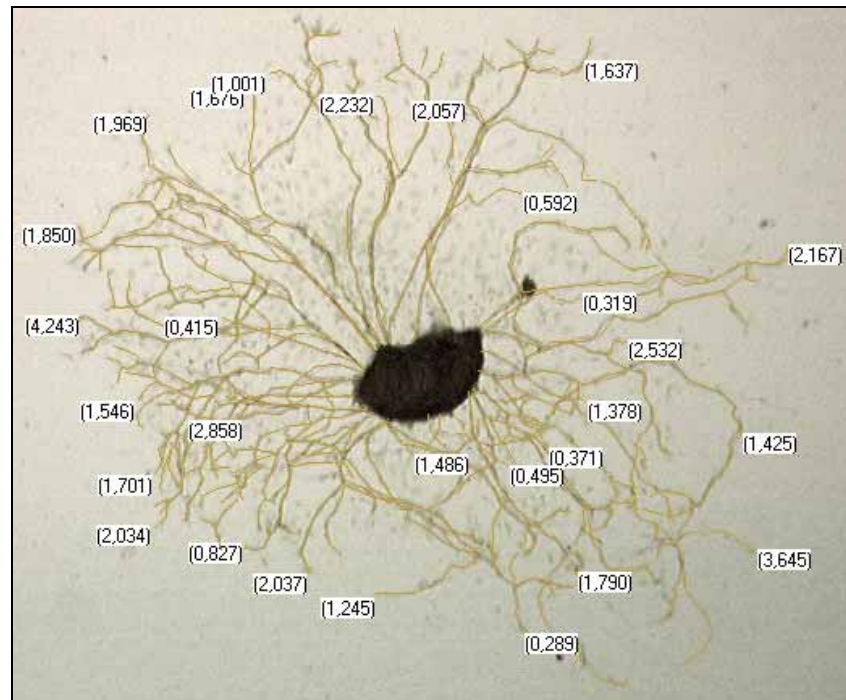


Abbildung 2-8: Vermessenes Spiralganglienzell-explantat.

Zunächst mussten mit dem Computer die auswachsenden Neuriten nachgezeichnet werden. Ein Computerprogramm konnte dann anhand eines zuvor fotografierten und vermessenen Maßstabs, die Länge der Fortsätze ermitteln. Die Angaben sind in Millimeter.

2.3.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchung wurden anhand des Student-T-Test ausgewertet.

Die Daten der vermessenen Neuriten wurden gemittelt, gruppiert und mittels einfacher Varianzanalyse ((one-way) analysis of variance, ANOVA) verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Elektrophysiologische Untersuchung

3.1.1 Hörvermögen adulter Tiere

Untersucht wurde das Hörvermögen adulter VASP(-/-)- und Wildtyp-Mäuse. Hierbei konnte kein Unterschied bezüglich des Hörvermögens zwischen VASP-defizienten Tieren und Wildtypen in der BERA beobachtet werden.

3.1.2 Hörbeginn bei Wildtypen und VASP-defizienten Tieren

In einer zweiten Versuchsreihe wurde mit der gleichen Methode die Hörentwicklung neugeborener Mäuse zwischen dem 7. und 18. postnatalen Tag dargestellt. Schon ab dem 9. postnatalen Tag zeigten einige Wildtyp-Tiere in den BERA-Ableitungen erste auditorische Antworten. Die Hörschwelle sank bis zur zweiten Lebenswoche auf Werte zwischen 60 dB SPL und 20 dB SPL. Bei den VASP(-/-)-Tieren konnte ein verzögerter Hörbeginn dargestellt werden. Antworten waren erst ab dem 11. Lebenstag ableitbar. Eine Normalisierung der Hörschwelle auf Werte unter 60 dB SPL konnte bei diesen Tieren erst ab der dritten Lebenswoche festgestellt werden. Die Daten resultieren aus einem Kollektiv von 15 Wildtypen und 14 VASP(-/-)-Tieren.

Die Messungen erfolgten täglich um die gleiche Zeit. Die Hörentwicklung wurde bis in die dritte Lebenswoche aufgezeichnet. Vom 11. bis 14. postnatalen Tag konnte ein signifikanter Unterschied der Hörschwellen von Wildtyp- und VASP-defizienten Mäusen beobachtet werden. In diesem Zeitraum konnten deutlich niedrigere Hörschwellen der Wildtypen gemessen werden, deren Werte am Ende der zweiten Lebenswoche Werte adulter Tiere erreichten. Im weiteren Verlauf wurde dieser Unterschied immer geringer und die Hörschwellen der beiden Gruppen näherten sich einander an (Abbildung 3-1).

Dies bestätigt die vorangegangenen Beobachtungen, dass bei adulten Tieren kein Unterschied der Hörleistung feststellbar war.

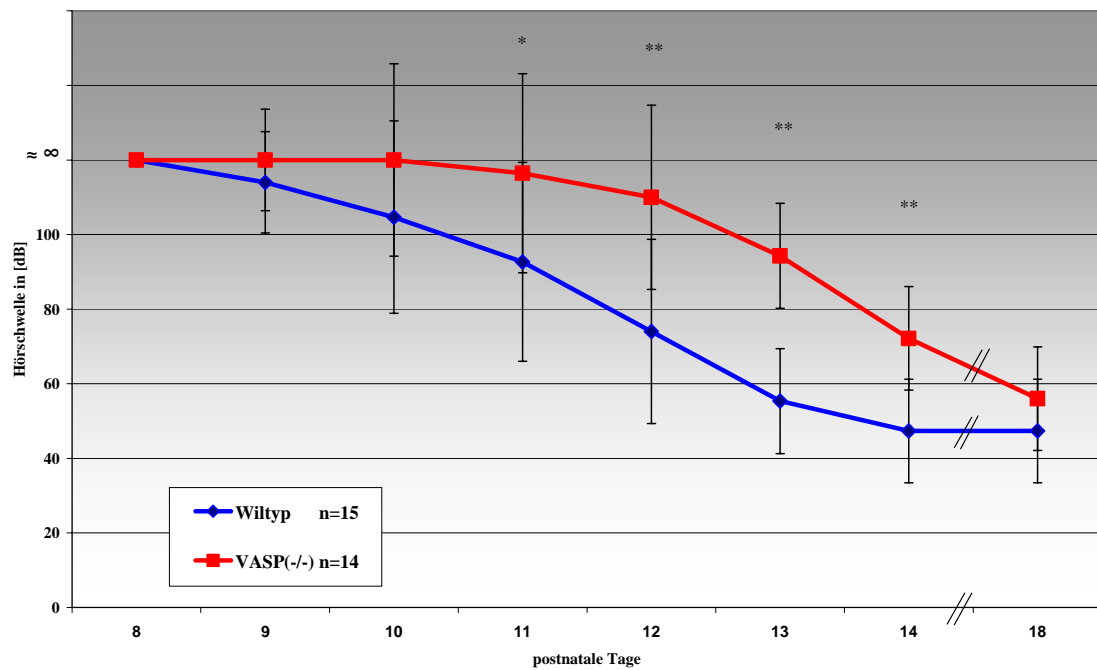


Abbildung 3-1: Hörentwicklung der Versuchstiere in den ersten Lebenswochen.

Die VASP(-/-)-Mäuse (rot) zeigen eine verzögerte Hörentwicklung in den ersten zwei postnatalen Wochen. Jenseits der dritten Lebenswoche erreichen sowohl Wildtypen (blau), als auch die VASP(-/-)-Tiere ein adultes Hörvermögen. Als Fehlerindikator dient die Standardabweichung.

* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$

3.2 Zellkultur

3.2.1 Neuritenwachstum auf Laminin

Die Neuritenzahl der Spiralganglienzellen wurde in Abhängigkeit von Lamininbeschichtung anhand von 10 Wildtypen- und 9 VASP(-/-)-Explantaten bestimmt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen war nicht nachzuweisen (Abbildung 3-2). Die Explantate, in denen kein VASP exprimiert wurde, zeigten auf der Lamininbeschichtung ein besseres Wachstumsverhalten in Bezug auf die Neuritenlänge. Die Neuriten der VASP(-/-)-Explantate waren gemittelt signifikant ($p < 0,01$) länger als die der Wildtypen (Abbildung 3-3).

3.2.2 Neuritenwachstum unter NT-3 Stimulation

Es wurden 9 Wildtyp- und 11 VASP(-/-)-Explantate mit NT-3 stimuliert. Bezüglich der Neuritenzahl konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Unter NT-3 Stimulation zeigte sich ein gesteigertes Längenwachstum der Neuriten von Wildtyp-Explantaten gegenüber den Explantaten VASP-defizienter Tiere. Die Neuriten der Wildtyp-Spiralganglien wuchsen im beschriebenen Zeitraum signifikant ($p < 0,0001$) länger als die der VASP(-/-)-Explantate (Abbildung 3-2).

3.2.3 Neuritenwachstum auf Laminin und unter NT-3 Stimulation

Bei gleichzeitiger Stimulation mit NT-3 und Lamininbeschichtung konnte weder bezüglich der Anzahl der Neuriten, noch deren Länge ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 3-2).

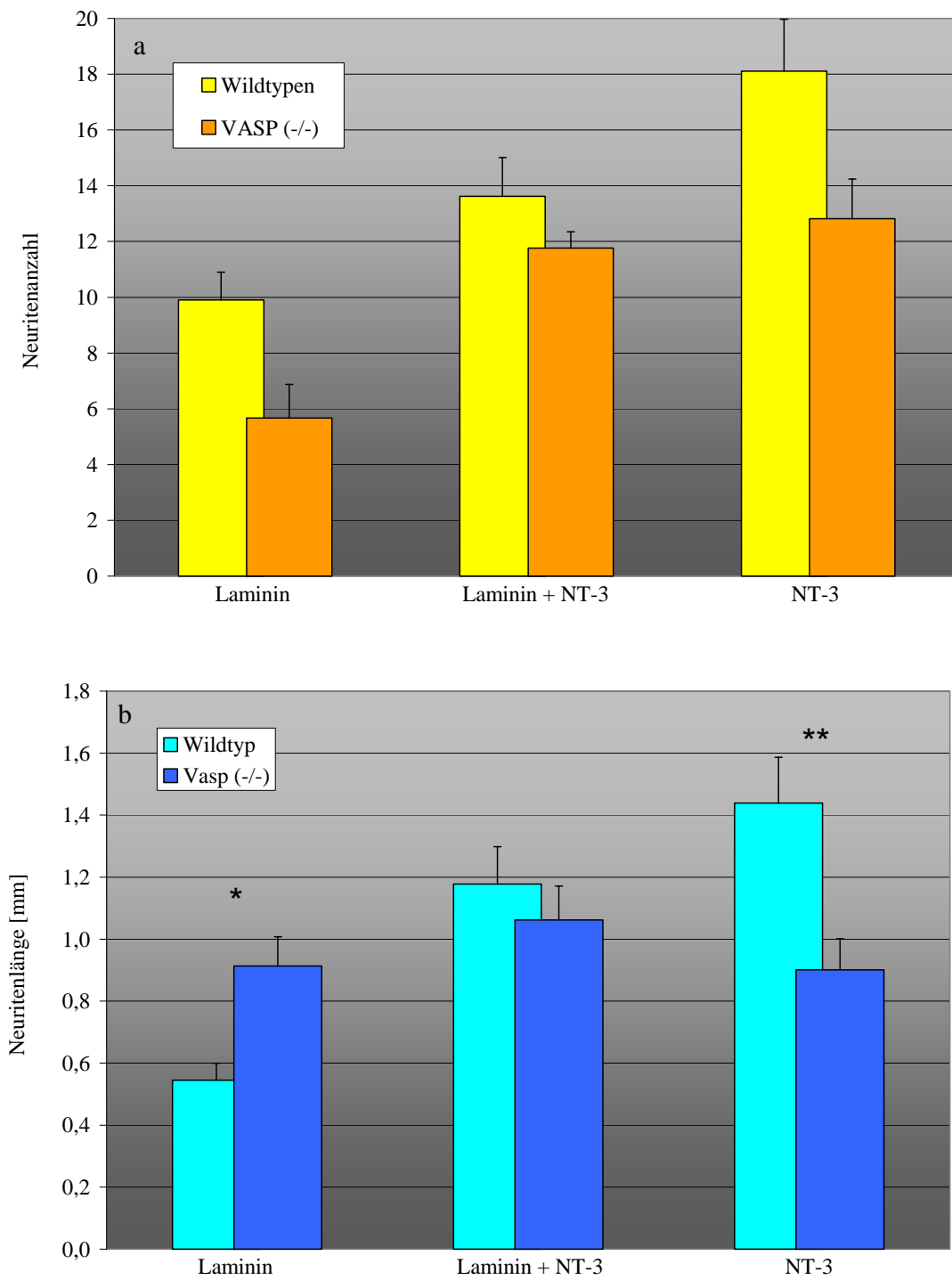


Abbildung 3-2: Neuritenwachstum von SG-Explantaten auf Laminin, NT-3 und unter NT-3-Stimulation.

Die Abbildungen zeigen das Wachstumsverhalten der SG-Explantate von Wildtypen und VASP(-/-)-Tieren auf Laminin und unter NT-Stimulation bezüglich der Anzahl (a) bzw. der Länge (b) der Fortsätze. Als Fehlerindikator dient der Standardfehler des Mittelwertes (SEM). * $p < 0.01$, ** $p < 0,001$

4 Diskussion

4.1 Elektrophysiologische Untersuchung

Tierexperimentelle Untersuchungen werden notwendig, wenn alternativ kein geeignetes *in vitro*-Modell für die entsprechende Fragestellung herangezogen werden kann. Für Versuche am lebenden Tier sind eine artgerechte Haltung und eine für das Tier erträgliche Behandlung unabdingbar. Die ethischen sowie juristischen Voraussetzungen sind im Tierschutzgesetz (§8 Abs. 1) beschrieben und müssen zwingend umgesetzt werden.

4.1.1 Narkose

Eine Reihe von Untersuchungen und Eingriffen benötigen eine ausreichende Anästhesie. Diese fordert eine suffiziente Sedierung und Analgesierung der Tiere, darf aber den geplanten Eingriff nicht beeinflussen. Die meisten dieser Techniken stellen invasive Methoden dar (z.B. Injektion, Intubation oder Tracheotomie) oder haben eine für die Tiere länger andauernde und unangenehme Ein- und Ausleitungsphase (z.B. Ätheranästhesie) zur Folge. Eine weit verbreitete Methode stellt die intraperitoneale Injektion von Medikamenten wie Pentobarbital (Borg and Viberg 1987; Geal-Dor et al. 1993; Lidan et al. 1992; Murofushi et al. 1994; Overbeck and Church 1992), Urethan (Kitamura et al. 1994) und Chloralhydrat (Pukkila et al. 1997) dar. Als Alternative werden die intramuskuläre Injektion von Ketamin/Xylazin (Zhou et al. 1995) und die intravenöse Applikation von Methohexital (Laurent et al. 1988) beschrieben. Inhalationsnarkosen werden mit Äther (Blatchley et al. 1987; Freeman et al. 1996) oder durch die Gabe von Halothan nach orotrachealer Intubation (Kitamura et al. 1994; Plantz et al. 1981) durchgeführt. Als weitere Methode vor allem für operative Eingriffe wird die Lagerung der Versuchstiere auf Eis beschrieben (Luo et al. 1995). Dies verursacht eine Hypothermie und somit Schmerzfreiheit sowie eine herabgesetzte Blutungsneigung. Die Ableitung akustisch evozierter Potentiale ist jedoch durch das Absenken der Körpertemperatur beeinträchtigt und ist nicht mehr zuverlässig reproduzierbar (Stockard et al. 1978). Bei der für diese Arbeit verwendeten Methode wurde für die Inhalationsnarkose auf eine orotracheale Intubation verzichtet (Dazert et

al. 2000). Da das beschriebene Maskenäquivalent nicht vollständig abgedichtet werden konnte und eine Teilinhalation durch den Untersucher nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde Halothan durch Isofluran ersetzt. Für die Inhalation von Halothan sind Stoffwechselforgänge in der Leber beschrieben, die diese schädigen und Hepatitis verursachen können (Anonymous 1966; Ray and Drummond 1991; Trowell et al. 1975; Wright et al. 1975). Die Verwendung von Isofluran konnte erfolgen, da in verschiedenen Studien die Effekte von Isofluran und Halothan auf die Amplitude akustisch evozierter Potentiale als sehr ähnlich (Bimar-Blanc et al. 1988; Lloyd-Thomas et al. 1990; Sebel et al. 1986), bzw. die Unterschiede als „nicht relevant“ (Heneghan et al. 1987) beschrieben werden. Unter den modifizierten Bedingungen konnte die Narkosetiefe der Untersuchung ebenfalls gut gesteuert werden. Durch die zügige Einleitung und kurze Narkosedauer ließ sich eine Hypothermie vermeiden. Die narkotisierten Tiere erholten sich nach den Messungen und der Aufwachphase ohne erkennbare Folgen.

4.1.2 BERA

Akustisch evozierte Potentiale (BERA, ABR) bieten eine nicht invasive Möglichkeit, die Funktionen des achten Hirnnerven und des auditorischen Hirnstammes zu messen.

Diese werden seit vielen Jahren routinemäßig in der klinischen Diagnostik eingesetzt. Die Entwicklung des Innenohres, des achten Hirnnerven, des auditorischen Hirnstammes und der dazugehörigen Interpretation der Ergebnisse der BERA-Messung wurde in verschiedenen Arbeiten an den unterschiedlichsten Spezies beschrieben. Diese Untersuchungen beinhalten BERAs von Menschen (Hecox and Galambos 1974; Salamy 1984; Salamy and McKean 1976; Starr et al. 1977), Primaten (Doyle et al. 1983; Kraus et al. 1985), Katzen (Jewett and Romano 1972; Laukli and Mair 1981; Laukli and Mair 1982; Mair et al. 1978; Shipley et al. 1980; Walsh et al. 1986a; Walsh et al. 1986b; Walsh et al. 1986c), Ratten (Church et al. 1984; Iwasa and Potsic 1982; Jewett and Romano 1972; Tokimoto et al. 1977), Mäusen (Henry and Haythorn 1978), Meerschweinchen (Dum 1984) und Wüstenrennmäusen (Smith and Kraus 1987).

Verschiedene Studien gehen davon aus, dass die elektrophysiologische Entwicklung der auditiven Funktion von Säugetieren in zwei Phasen abläuft. Bereits in der frühen Phase entwickelt sich die auditive Funktion sehr rasch, so dass die Hirnstammaudiometrie von

jungen Tieren ähnliche Resultate liefert wie adulte Tiere. Der frühen Phase folgt eine zweite, die einer Feineinstellung entspricht (Fria and Doyle 1984; Iwasa and Potsic 1982; Walsh et al. 1986a; Walsh et al. 1986b; Walsh et al. 1986c). Es wird vermutet, dass akustisch evozierte Potentiale der frühen Phase primär die Reifung der Cochlea und die der späten Phase die Entwicklung zentraler Abschnitte auditiver Bahnen darstellen (Fria and Doyle 1984).

4.2 Zellkultur

In Zellkulturexperimenten kann nicht ohne weiteres zwischen Axonen und Dendriten differenziert werden. In der vorliegenden Arbeit werden die Nervenfortsätze deshalb als Neuriten bezeichnet. Experimentelle Einflüsse auf das Nervenwachstum zeigen sich z.B. in einer Änderung der Anzahl oder auch der Länge der neuronalen Fortsätze und können auf diese Weise quantifiziert werden.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben neuronales Wachstum anhand der Kultivierung ganzer SG-Explantate (Pirvola et al. 1992) oder durch qualitatives Auszählen (Ebendal 1989) beobachtet. Erzeugte Bilder wurden dazu benutzt, eine Fläche zu bestimmen, die fiktiv von den ausgewachsenen Neuriten gebildet wurde (Bilsland et al. 1999). Diese Methode ist zwar schnell und einfach auszuwerten, trägt aber der absoluten Anzahl und Länge der ausgewachsenen Neuriten wenig Rechnung. Eine höhere quantitative Genauigkeit erreicht man durch das Auszählen und Ausmessen der einzelnen Neuriten (Dazert et al. 1998b; Liu et al. 1988). In der vorliegenden Arbeit wurde jeder einzelne Neurit mit Hilfe eines Computerprogramms nachgezeichnet und die linearen Teilstrecken zu einer Gesamtlänge addiert. Dies stellt eine deutliche Näherung an die tatsächliche Länge der nicht linearen Neuritenfortsätze dar (Mlynski et al. 2002).

4.3 Bedeutung von VASP für das Hörvermögen

Die elektrophysiologischen Ergebnisse dieser Arbeit beziehen sich primär auf die frühe postnatale Phase, in der die eigentliche Innervation der Cochlea stattfindet. Sie zeigen eine verzögerte Hörentwicklung der VASP(-/-)-Tiere verglichen mit den Wildtyp-Kontrollen. Für diese Beobachtung ist eine Reihe von Erklärungen denkbar. So könnte beispielsweise die Rolle von VASP bei der Organisation des Zytoskelettes (Lanier et al. 1999; Lanier and Gertler 2000; Reinhard et al. 2001) sowie die Beobachtung, dass VASP-Proteine zeitgleich mit dem Hörbeginn in den Pillarzellen der Cochlea nachgewiesen werden (Schick et al. 2003), über eine veränderte Steifigkeit und Mechanik der Cochlea in VASP(-/-)-Tieren spekulieren lassen. Das Fehlen von VASP könnte eine verzögerte Organisation des Zytoskelettes durch veränderte Aktindynamik in den Pillarzellen zur Folge haben. Ebenfalls lässt der vermehrte Nachweis von VASP in der Stria vascularis über eine Veränderung in der Entstehung endocochleärer Potentiale oder der Endolymph spekulieren (Schick et al. 2003).

Einen weiteren Ansatz zur Erklärung der verzögerten Hörentwicklung der VASP(-/-)-Tiere bietet die Tatsache, dass viele Proteine aus der Familie der Ena/VASP-Proteine die beschriebenen Domänen EVH1, EVH2 und ein prolinreiches Motiv aufweisen (Reinhard et al. 2001). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Verlust von Ena in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) deren Letalität zur Folge hatte. Transgene Tiere, die statt Ena humanes VASP produzierten, waren zu 25-80% lebensfähig und konnten zu adulten Tieren heranreifen. Diese hatten einen unauffälligen Phänotyp und waren fertil. VASP konnte somit Ena funktionell, wenn auch suboptimal ersetzen (Ahern-Djamali et al. 1998). Denkbar wäre, dass auch der Verlust von VASP durch ein verwandtes Protein, wenn auch nicht optimal kompensiert wird. Ein solches „Einspringen“ eines anderen Proteins würde eventuell auch eine veränderte Dynamik in der Entwicklung des Hörorgans bei einem sonst unauffälligen Phänotyp bedingen. Dies könnte eine mögliche Erklärung für den verzögerten Hörbeginn darstellen.

Die Beobachtung, dass VASP in SG-Neuronen zeitgleich mit der finalen Innervation des Cortischen Organs exprimiert wird, lässt über die Bedeutung von VASP bei der Ausreifung der Spiralganglienneuriten nachdenken. Diese Theorie wird durch die hier vorgestellten Ergebnisse unterstrichen, in denen sich das Neuritenwachstum von SG-Explantaten von VASP(-/-)-Tieren in Zellkultur signifikant von dem der Wildtypkontrollen unterscheidet. Unterschiede in der Maturation der SG-Neuriten VASP-defizienter Mäuse könnten durch veränderte Prozesse im Wachstumskegel bedingt sein, wobei die Organisation und Polymerisation von Aktin von bedeutender Rolle ist. Als Wachstumskegel bezeichnet man die Struktur an der Spitze des Nervenfortsatzes, der für dessen Längenwachstum vom Zellsoma und das exakte Einwachsen („Guidance“) in das Zielgebiet verantwortlich gemacht wird. Hierbei werden Form und Dynamik des Wachstumskegels von seinem Zytoskelett bestimmt. Vom Wachstumskegel gehen Lamellipodien aus, fächerförmige Ausstülpungen der neuronalen Zellmembran, die sich oft zwischen zwei lang ausgezogenen Strukturen, den Filopodien befinden (Abbildung 4-1). Lamellipodien bestehen aus einem dichten Netzwerk von Aktinfilamenten. Filopodien hingegen entstehen durch lang ausgezogene Aktinfilamente, die einen retrograden Fluss von Aktin entgegen der Wachstumsrichtung des Filopodiums aufweisen (Korey and Van Vactor 2000; Suter and Forscher 1998). Der Fluss kommt durch eine membrannahe Polymerisation und eine zentrale Depolarisation des Aktins zustande und bewirkt die Wachstumsdynamik dieses Systems. Hierbei wird VASP eine Rolle bei der Beeinflussung dieser Dynamik zugeschrieben (Korey and Van Vactor 2000).

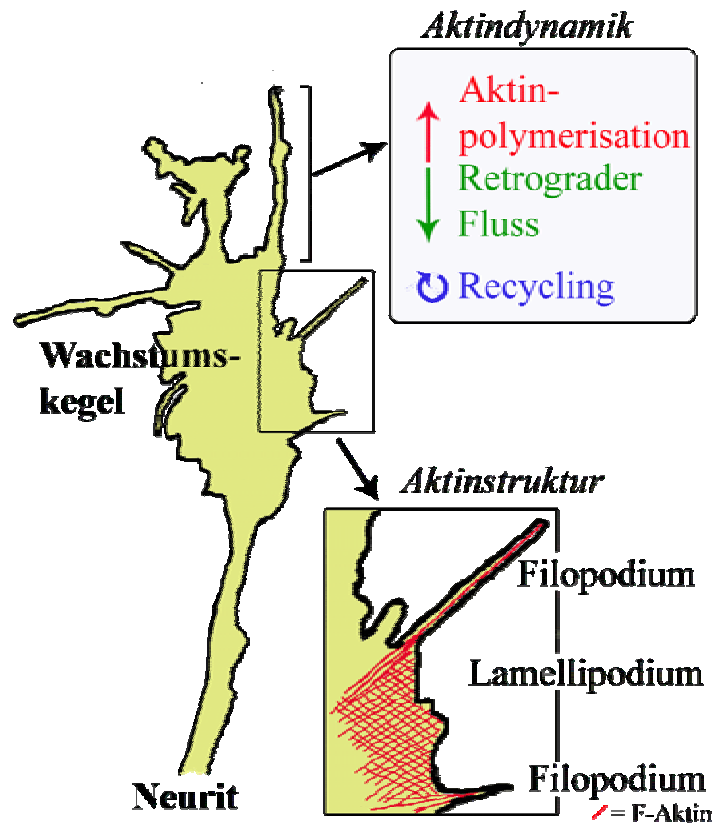


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des Wachstumskegels eines auswachsenden Neuriten.

Der Wachstumskegel eines auswachsenden Neuriten besteht aus einem Zentrum, Lamellipodien und Filopodien. Die vergrößerte Region unten rechts zeigt das Aktingerüst, welches im Bereich der Lamellipodien ein dichtes Netzwerk bildet und sich im Filopodium als lang ausgezogene parallele Filamente organisiert. Beide dieser Strukturen sind dynamisch. Die Darstellung rechts oben soll die Richtung der Aktinpolymerisation verdeutlichen. Hierbei werden membrannah Aktinmonomere angelagert. Das ganze Filament bewegt sich dadurch entgegen der Wachstumsrichtung (Korey and Van Vactor 2000).

Das Auswachsen der Lamellipodien und Filopodien des Wachstumskegels wird als eine rezeptorgesteuerte Interaktion des Aktinnetzwerkes mit seiner Umwelt verstanden (Korey and Van Vactor 2000). Auch hierbei ist eine potentielle Beteiligung von VASP-Proteinen denkbar.

Die SG-Zelle scheint in der Lage zu sein, sowohl mit körperfremden Stoffen, so genannten alloplastischen Materialien (z.B. Titan, Gold, Platin, Stahl, Silikon; Brors et al. 2002), als auch mit Proteinen zu interagieren, die vom Organismus selbst produziert werden (Aletsee et al. 2000; Aletsee et al. 2003; Dazert et al. 1998b). *In vitro* wurde auf Laminin ein signifikant längeres Auswachsen der SG-Neuriten, verglichen mit anderen Proteinen der Extrazellulärmatrix (ECM), beschrieben (Aletsee et al. 2002b). Laminin scheint demnach einen entscheidenden Faktor für die Neuritenelongation darzustellen (Aletsee et al. 2001b; Aletsee et al. 2002b). Hierbei geht man davon aus, dass die Neuritenzahl repräsentativ für das Überleben der SG-Zellen und somit deren Fähigkeit zur Aussprossung ist. Es wird vermutet, dass Laminin auch für Innervationsprozesse der Cochlea eine Rolle spielt (Cosgrove and Rodgers 1997). Im Cortischen Organ konnte eine zeitgleiche Expression bestimmter Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) mit der Synapsenbildung der SG-Neuriten und den Haarzellen nachgewiesen werden (Woolf et al. 1992). *In vivo* kann Laminin um das Spiralganglion und entlang des Weges zu den Haarzellen, den die Fortsätze während der Entwicklung zurücklegen, nachgewiesen werden (Cosgrove and Rodgers 1997).

Interaktionen der SG-Neurone mit Laminin als Vertreter der ECM-Proteine werden über Integrinrezeptoren (Drenckhahn 2003; Hynes and Lander 1992; Reichardt and Tomaselli 1991) vermittelt. Integrine wurden an vielen Stellen des Nervensystems nachgewiesen. Sie sind in die verschiedensten Entwicklungsprozesse involviert und scheinen für Zellmigration, Axonenwachstum und zielgerichtete Zellbewegung („Guidance“) wichtig zu sein. Eine veränderte Rezeptorkinetik könnte eine veränderte Interaktion und somit ein differentes Auswachsen der SG-Zellfortsätze bedingen. Desweiteren sind Interaktionen von mit dem Zytoskelett assoziierten Proteinen (z.B. Vinculin und Talin) und mit Signalproteinen (z.B. FAK, Rho und Src) beschrieben worden (Ginsberg et al. 1992; Schoenwaelder and Burrridge 1999). Deswegen kann es von Bedeutung sein, dass die EVH1-Domäne des VASP-Proteins mit Vinculin interagiert (Niebuhr et al. 1997; Reinhard et al. 1999). Für Src sind ebenfalls

Interaktionen sowohl mit VASP, Mena als auch Ena bekannt (Ahern-Djamali et al. 1999; Gertler et al. 1996). Hierbei wird eine direkte Beteiligung von VASP in den Signalwegen des Zytoskelettes und der Extrazellulärmatrix vermutet (Suter and Forscher 2000).

An der Ausbreitungsrichtung des Wachstumskegels und der Neuritenelongation sind neben Proteinen der extrazellulären Matrix (Clark et al. 1993; Schmidt et al. 1995; Weaver et al. 1995) auch Neurotrophine (Despres and Romand 1994; Lefebvre et al. 1991b) und Mitglieder der FGF-Familie (Dazert et al. 1998b; Luo et al. 1993; Luo et al. 1995) beteiligt. Dabei werden Wachstum, Überleben der Zelle und Organisation des Zytoskelettes beeinflusst (Clark and Brugge 1995; Ernfors et al. 1992; Ernfors et al. 1994a; Ernfors et al. 1994b; Pirvola et al. 1994; Pirvola et al. 1992; Ruoslahti and Reed 1994; Venstrom and Reichardt 1993). Für NT-3-defiziente-Mäuse ist durch immunhistochemische Untersuchungen eine Reduktion der SG-Neurone in der Cochlea um 85% beschrieben worden (Farinas et al. 1994). Das unterstreicht die Bedeutung dieses Faktors für das Überleben der SG-Zellen. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich sowohl Laminin als Vertreter der ECM-Proteine (Aletsee et al. 2001b; Aletsee et al. 2002b) als auch NT-3 stellvertretend für die Neurotrophine (Aletsee et al. 2001a) positiv auf die Neuritenanzahl von SG-Zellen in organotypischer Zellkultur auswirken. Die sich entwickelnde Haarzelle ihrerseits produziert biologisch aktive Substanzen, welche die Entwicklung und den Erhalt der Neuriten unterstützen und das Einwachsen in das Zielorgan fördern. Als Vertreter dieser wachstumsstimulierenden Substanzen kommen die Neurotrophine NT-3 und BDNF (Ernfors et al. 1992; Ernfors et al. 1994a; Ernfors et al. 1994b; Pirvola et al. 1994; Pirvola et al. 1992), sowie Mitglieder der FGF-Familie (Dazert et al. 1998b; Luo et al. 1993; Luo et al. 1995) in Frage.

Verschiedene Mitglieder der Neurotrophin-Familie können die Aktinkonzentration im Wachstumskegel erhöhen oder erniedrigen. So führt NT-3 am entsprechenden Zielgewebe zu einer Konzentrationserhöhung von Aktin. Dagegen bewirken z. B. BDNF und NT-4/5 an Neuriten, deren Auswachsen vor allem auf die NT-3 Wirkung angewiesen ist, eine Konzentrationsminderung von Aktin und führen zum Kollaps des Wachstumskegels. Es wird vermutet, dass verschiedene Neurotrophine gleichzeitig chemotaktische sowie inhibitorische Funktionen am selben Wachstumskegel ausüben

(Paves and Saarma 1997). Neurotrophine nehmen somit entscheidenden Einfluss auf die Modulation und die Mobilität des Wachstumskegels (Gallo and Letourneau 1998; Paves and Saarma 1997; Zhang et al. 1999). Es ist bekannt, dass auswachsende Filopodien in ihren Enden, in denen die Aktinpolymerisation vonstatten geht, Ena/VASP Proteine enthalten (Lanier et al. 1999; Pistor et al. 1995). Das geringere Wachstum von VASP(-/-)-Explantaten unter NT-3 Stimulation lässt vermuten, dass auch VASP in die NT-3 induzierte aktinvermittelte Bewegung des Wachstumskegel involviert ist. Hierbei scheint die Konzentration von VASP mit der Beweglichkeit des Filopodiums zu korrelieren (Rottner et al. 1999).

Es konnten erste Signalwege aufgezeigt werden, über die Neurotrophine das Auswachsen der Neuriten *in vitro* beeinflussen (Aletsee et al. 2001a). Verschiedene Autoren gehen davon aus, dass Neurotrophine vom Zielgewebe der Spiralganglienzellen produziert sowie sezerniert werden und chemotaktisch Einfluss auf Wachstumsverhalten und Wachstumsrichtung der Neuriten nehmen (Despres and Romand 1994; Lefebvre et al. 1991b). Ebenfalls gibt es Hinweise darauf, dass Proteine der Ena/VASP-Familie mit einer Familie von Wachstumsfaktorrezeptoren die Aktinpolymerisation sowohl in Lamellipodien als auch in Filopodien beeinflussen (Krugmann et al. 2001). Diese Funktion von VASP könnte das beobachtete langsamere Auswachsen der VASP-defizienten SG-Neuriten *in vitro* unter NT-3-Stimulation erklären. Eine direkte Stimulation des Neuritenwachstums durch Laminin ist für den RAC-GTP und cdc42-GTP Signalweg nachgewiesen (Meyer and Feldman 2002). Blockt man diesen Proteinkomplex, kann man ein vermindertes Auswachsen von SG-Neuriten beobachten (Brors et al. 2003).

Das gesteigerte Neuritenwachstum von VASP-defizienten SG-Explantaten auf Laminin lässt vermuten, dass sich der Wirkmechanismus von VASP bezüglich der Signalwege über Integrinrezeptoren von denen der Neurotrophine unterscheidet.

VASP-Defizienz kann die ebenfalls integrinvermittelte Plättchenaggregation in Thrombozyten verstärken sowie die durch zyklische Nukleotide verursachte Hemmung der Plättchenaggregation abschwächen und die Bindung von Fibrinogen an Integrin reduzieren. Der Mechanismus der VASP-Integrin-Interaktion ist jedoch noch weitgehend ungeklärt. Man geht davon aus, dass der beschriebene Prozess das Ergebnis einer Modulation der Signalwege vom Integrinrezeptor zum Zytoskelett oder VASP-

regulierten Stressfaserbündeln darstellt (Reinhard et al. 2001). Laminin könnte so durch Vermittlung der Integrinrezeptoren ein gesteigertes Wachstum der Neuriten von VASP-defizienten-Explantaten induzieren.

Alternativ wurde gezeigt, dass VASP an weitere Moleküle bindet, die für die Kontrolle des Auswachsens von Neuriten verantwortlich gemacht werden. Solche Proteine sind Robo und Semaphorin 6A-1. Sie werden für die von Netrin induzierte Abstoßung und die retrograde Bewegung von Filopodien benötigt (Bashaw et al. 2000; Colavita and Culotti 1998; Klostermann et al. 2000; Lebrand et al. 2004).

Bei der Anzuchtung auf Laminin unter NT-3-Stimulation zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Länge der ausgewachsenen Neuriten von VASP(-/-)- und Wildtyp-Explantaten. Dies lässt auf einen entgegengesetzten Effekt des Verlustes von VASP auf die beiden Faktoren schließen, so dass sich die Wirkungen aufheben. Diese Beobachtung unterstützt die These, dass VASP verschiedene, auf den Wachstumskegel einwirkende Signale modulieren kann.

Proteine der Ena/VASP-Familie nehmen unter anderem eine regulierende Rolle am Wachstumskegel ein (Chakraborty et al. 1995; Gertler et al. 1996; Kang et al. 1997). Dies ist nach der vorliegenden Arbeit auch für die SG-Neuriten anzunehmen. In der komplexen Umgebung des sich entwickelnden Cortischen Organs könnte das Fehlen dieser Modulation ein verändertes Wachstumsverhalten der Neuriten zur Folge haben. Es kann hierbei spekuliert werden, dass nur geringe Veränderungen dieses Systems die Innervation der Haarzellen und somit die Hörentwicklung verzögern. Eine verminderte Antwort auf von den Haarzellen produzierte Wachstumsfaktoren könnte das zielgenaue Einwachsen der Neuriten verlangsamen.

Dem gegenüber ist bekannt, dass SG-Neuriten während der Innervationsphase physiologischerweise über ihr Zielgebiet, die inneren Haarzellen, in die Region der äußeren Haarzellen hinaus wachsen, sich im weiteren Verlauf dann wieder retrahieren, um am ursprünglichen Ziel Synapsen zu bilden (Echteler 1992). Ein gesteigertes Überschießen der Neuriten würde für das Erreichen der adulten Morphologie ebenfalls mehr Zeit in Anspruch nehmen.

Während der Verlust von VASP das Auswachsen der Spiralganglienneuriten von neonatalen Explantaten *in vitro* sowie eine verzögerte Entwicklung der auditorischen

Funktion *in vivo* zur Folge hat, konnte kein Effekt auf die adulte Cochlea beobachtet werden. Dies könnte bedeuten, dass VASP im ausdifferenzierten neuronalen Gewebe des Innenohres funktionell von untergeordneter Rolle ist, oder dass die auf der VASP-Defizienz beruhenden Verzögerungen während der perinatalen Innervation des Corti-Organ durch VASP-verwandte Substanzen adäquat ausgeglichen werden.

5 Zusammenfassung

Das „vasodilator-stimulated phosphorprotein“ (VASP), ein Mitglied der Ena/VASP Proteinfamilie, gilt als ein entscheidender Faktor bei der Regulation von Aktindynamik. Es ist an Zellbeweglichkeit und –adhäsion, unter anderem in Filopodien und dem Wachstumskegel auswachsender Neurone beteiligt. Anhand dieser Beobachtung wurde die Rolle von VASP für das Hörvermögen und der Hörentwicklung der Säugetiere an einem Mausmodell evaluiert.

Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durch Analyse von VASP-defizienten-Mäusen (VASP(-/-)) erreicht werden. Einerseits wurde das Hörvermögen und der Hörbeginn von VASP-defizienten-Tieren mit dem von Wildtypen (WT) elektrophysiologisch anhand der Hirnstammaudiometrie verglichen, andererseits das Wachstumsverhalten von Spiralganglienzellexplantaten der WT- und VASP(-/-)-Tiere in Zellkultur auf Lamininbeschichtung und unter NT-3 Stimulation analysiert.

Bei den elektrophysiologischen Untersuchungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Hörvermögen adulter Tiere. Bei einer Verlaufstudie der Hörentwicklung wurden Differenzen des Hörbeginns zwischen dem 11. und 14. postnatalen Tag beobachtet. Der Hörbeginn war bei den VASP(-/-)-Mäusen in dieser Phase signifikant verzögert. Die Entwicklung des Hörvermögens von VASP(-/-)-Tieren war in den ersten zwei Lebenswochen verzögert, erreichte danach aber normale Werte.

Bei der Analyse des Wachstums der Spiralganglienneuriten zeigten sich keine statistisch signifikanten Differenzen bezüglich der Anzahl der auswachsenden Fortsätze.

Unterschiede der Neuritenlänge beider Gruppen, waren auf Laminin und unter NT-3 Stimulation zu beobachten. Die Neuriten der VASP(-/-)-Gruppe wuchsen auf Laminin signifikant länger als die Kontrollen der WT-Gruppe. Unter der Stimulation mit NT-3, war ein statistisch signifikant geringes Längenwachstum der VASP(-/-)-Gruppe zu beobachten.

Auf Lamininbeschichtung und unter gleichzeitiger Stimulation mit NT-3 konnte kein signifikanter Wachstumsunterschied der WT- und VASP(-/-)-Gruppe beschrieben werden.

Die Ergebnisse der Untersuchung deuten darauf hin, dass VASP an der Hörentwicklung des Säugetieres beteiligt ist, für das adulte Hörvermögen jedoch von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint.

Der verzögerte Hörbeginn der VASP(-/-)-Tiere könnte durch eine verspätete Innervation des Cortischen Organs, aufgrund des beobachteten veränderten Wachstumsverhaltens von VASP-defizienten SG-Zellen, bedingt sein. Dies ließe sich sowohl durch ein langsames Auswachsen der Neuriten des Spiralganglions als auch durch eine Verzögerung der zielgerichteten Synapsenbildung mit dessen Erfolgsorgan, den Haarzellen erklären. Eine regelrechte Innervation der Haarzellen scheint jedoch bei den adulten Tieren vorzuliegen, da diese keine verminderte Hörleistung präsentieren.

Alternativ ist der funktionelle Ersatz von VASP, durch verwandte Proteine der Ena/VASP Familie zu diskutieren. Ein solches „Rescue“-Model könnte eine veränderte Dynamik der Entwicklung zur Folge haben, ohne dass im adulten Tier ein ausgeprägter Phänotyp zu erkennen ist.

6 Literaturverzeichnis

- Ahern-Djamali S. M., Bachmann, C., Hua, P., Reddy, S. K., Kastenmeier, A. S., Walter, U., and Hoffmann, F. M. (1999) Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for *Drosophila* enabled. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4977-82.
- Ahern-Djamali S. M., Comer, A. R., Bachmann, C., Kastenmeier, A. S., Reddy, S. K., Beckerle, M. C., Walter, U., and Hoffmann, F. M. (1998) Mutations in *Drosophila* enabled and rescue by human vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) indicate important functional roles for Ena/VASP homology domain 1 (EVH1) and EVH2 domains. *Mol Biol Cell* 9, 2157-71.
- Aletsee C., Beros, A., Mullen, L., Palacios, S., Pak, K., Dazert, S., and Ryan, A. F. (2001a) Ras/MEK but not p38 signaling mediates NT-3-induced neurite extension from spiral ganglion neurons. *J Assoc Res Otolaryngol* 2, 377-87.
- Aletsee C., Brors, D., Mlynski, R., Ryan, A. F., and Dazert, S. (2003) Branching of spiral ganglion neurites is induced by focal application of fibroblast growth factor-1. *Laryngoscope* 113, 791-796.
- Aletsee C., Brors, D., Mlynski, R., Ryan, A. F., and Dazert, S. (2002a) Wortmannin, ein spezifischer Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase, beeinflusst das neurotrophin-induzierte Wachstum von Spiralganglien neuriten. *Laryngorhinootologie* 81, 189-195.
- Aletsee C., Brors, D., Palacios, S., Pak, K., Mullen, L., Dazert, S., and Ryan, A. F. (2002b) The effects of laminin-1 on spiral ganglion neurons are dependent on the MEK/ERK signaling pathway and are partially independent of Ras. *Hear Res* 164, 1-11.
- Aletsee C., Mullen, L., Kim, D., Pak, K., Brors, D., Dazert, S., and Ryan, A. F. (2001b) The disintegrin kistrin inhibits neurite extension from spiral ganglion explants cultured on laminin. *Audiol Neurootol* 6, 57-65.
- Aletsee C., Völter, C., Brors, D., Ryan, A. F., and Dazert, S. (2000) Die Wirkung von Fibroblastenwachstumsfaktor-1 (FGF-1) auf Spiralganglienzellen der Säugetiercochlea. *Hno* 48, 457-61.
- Anonymous (1966) Summary of the national Halothane Study. Possible association between halothane anesthesia and postoperative hepatic necrosis. *Jama* 197, 775-88.
- Aszódi A., Pfeifer, A., Ahmad, M., Glauner, M., Zhou, X. H., Ny, L., Andersson, K. E., Kehrel, B., Offermanns, S., and Fassler, R. (1999) The vasodilator-stimulated

- phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *Embo J* 18, 37-48.
- Bachmann C., Fischer, L., Walter, U., and Reinhard, M. (1999) The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem* 274, 23549-57.
- Ball L. J., Jarchau, T., Oschkinat, H., and Walter, U. (2002) EVH1 domains: structure, function and interactions. *FEBS Letters* 513, 45-52.
- Ball L. J., Kühne, R., Hoffmann, B., Hafner, A., Schmieder, P., Volkmer-Engert, R., Hof, M., Wahl, M., Schneider-Mergener, J., Walter, U., Oschkinat, H., and Jarchau, T. (2000) Dual epitope recognition by the VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity. *Embo J* 19, 4903-14.
- Bashaw G. J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T., and Goodman, C. S. (2000) Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* 101, 703-15.
- Bear J. E., Krause, M., and Gertler, F. B. (2001) Regulating cellular actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* 13, 158-66.
- Bear J. E., Svitkina, T. M., Krause, M., Schafer, D. A., Loureiro, J. J., Strasser, G. A., Maly, I. V., Chaga, O. Y., Cooper, J. A., Borisy, G. G., and Gertler, F. B. (2002) Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 109, 509-21.
- Békésy G. v. (1943) Über die Resonanzkurve und die Abklingzeit der verschiedenen Stellen der Schneckenwand. *Akustische Zeitschrift* 8, 66-79.
- Békésy, G v.: *Experiments in Hearing*. McGraw Hill, New York, 1960.
- Bilsland J., Rigby, M., Young, L., and Harper, S. (1999) A rapid method for semi-quantitative analysis of neurite outgrowth from chick DRG explants using image analysis. *J Neurosci Methods* 92, 75-85.
- Bimar-Blanc M. C., Dejode, J. M., and Bimar, J. (1988) [Effects of isoflurane and halothane on the auditory and somatosensory evoked potentials]. *Ann Fr Anesth Reanim* 7, 279-88.
- Blatchley B. J., Cooper, W. A., and Coleman, J. R. (1987) Development of auditory brainstem response to tone pip stimuli in the rat. *Brain Res* 429, 75-84.
- Borg E. and Viberg, A. (1987) Age-related hair cell loss in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Hear Res* 30, 111-8.
- Brors D., Aletsee, C., Dazert, S., Huverstuhl, J., Ryan, A. F., and Bodmer, D. (2003) Clostridium difficile toxin B, an inhibitor of the small GTPases Rho, Rac and

- Cdc42, influences spiral ganglion neurite outgrowth. *Acta Otolaryngol* 123, 20-25.
- Brors D., Aletsee, C., Schwager, K., Mlynski, R., Hansen, S., Schafers, M., Ryan, A. F., and Dazert, S. (2002) Interaction of spiral ganglion neuron processes with alloplastic materials in vitro(1). *Hear Res* 167, 110-21.
- Chakraborty T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, C. J., Jockusch, B. M., Reinhard, M., Walter, U., and et al. (1995) A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *Embo J* 14, 1314-21.
- Church M. W., Williams, H. L., and Holloway, J. A. (1984) Postnatal development of the brainstem auditory evoked potential and far-field cochlear microphonic in non-sedated rat pups. *Brain Res* 316, 23-31.
- Clark E. A. and Brugge, J. S. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268, 233-9.
- Clark P., Britland, S., and Connolly, P. (1993) Growth cone guidance and neuron morphology on micropatterned laminin surfaces. *J Cell Sci* 105, 203-12.
- Cohen-Salmon M., El Amraoui, A., Leibovici, M., and Petit, C. (1997) Otogelin: a glycoprotein specific to the acellular membranes of the inner ear. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 14450-14455.
- Colavita A. and Culotti, J. G. (1998) Suppressors of ectopic UNC-5 growth cone steering identify eight genes involved in axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Dev.Biol.* 194, 72-85.
- Cosgrove D. and Rodgers, K. D. (1997) Expression of the major basement membrane-associated proteins during postnatal development in the murine cochlea. *Hear Res* 105, 159-70.
- Dazert S., Baird, A., and Ryan, A. F. (1998a) Receptor-targeted delivery of an intracellular toxin to outer hair cells by fibroblast growth factor. *Hear.Res* 115, 143-148.
- Dazert S., Kim, D., Luo, L., Aletsee, C., Garfunkel, S., Maciag, T., Baird, A., and Ryan, A. F. (1998b) Focal delivery of fibroblast growth factor-1 by transfected cells induces spiral ganglion neurite targeting in vitro. *J Cell Physiol* 177, 123-9.
- Dazert S., Schömig, P., Shehata-Dieler, W. E., Aletsee, C., and Dieler, R. (2000) Eine Narkosetechnik für experimentelle Untersuchungen und mikrochirurgische Eingriffe am Ohr neugeborener Nagetiere. *Laryngorhinootologie* 79, 26-9.
- Despres G. and Romand, R. (1994) Neurotrophins and the development of cochlear innervation. *Life Sci* 54, 1291-7.

- Doyle W. J., Saad, M. M., and Fria, T. J. (1983) Maturation of the auditory brain stem response in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 56, 210-23.
- Draijer R., Vaandrager, A. B., Nolte, C., de Jonge, H. R., Walter, U., and van Hinsbergh, V. W. (1995) Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ Res* 77, 897-905.
- Drenckhahn, D.: Zellenlehre. In: Drenckhahn, D. (eds.), Benninghoff, Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie, Zellbiologie, pp. 9-88, Urban & Fischer Verlag, München, Jena 2003.
- Dum N. (1984) Postnatal development of the auditory evoked brainstem potentials in the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 97, 63-8.
- Ebendal, T.: Use of collagen gels in bioassay nerve growth factor activity. In: Rush, R. A. (eds.), *Nerve Growth Factors*, pp. 81-83, Wiley, Bath 1989.
- Echteler S. M. (1992) Developmental segregation in the afferent projections to mammalian auditory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6324-7.
- Ernfors P., Lee, K. F., and Jaenisch, R. (1994a) Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368, 147-50.
- Ernfors P., Lee, K. F., Kucera, J., and Jaenisch, R. (1994b) Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* 77, 503-12.
- Ernfors P., Merlio, J. P., and Persson, H. (1992) Cells Expressing mRNA for Neurotrophins and their Receptors During Embryonic Rat Development. *Eur J Neurosci* 4, 1140-1158.
- Farinas I., Jones, K. R., Backus, C., Wang, X. Y., and Reichardt, L. F. (1994) Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature* 369, 658-661.
- Freeman S., Cherny, L., and Sohmer, H. (1996) Thyroxine affects physiological and morphological development of the ear. *Hear Res* 97, 19-29.
- Fria T. J. and Doyle, W. J. (1984) Maturation of the auditory brain stem response (ABR): additional perspectives. *Ear Hear* 5, 361-5.
- Fritzsich B., Silos-Santiago, I., Bianchi, L. M., and Farinas, I. (1997) The role of neurotrophic factors in regulating the development of inner ear innervation. *Trends Neurosci* 20, 159-64.

- Gallo G. and Letourneau, P. C. (1998) Localized sources of neurotrophins initiate axon collateral sprouting. *J Neurosci* 18, 5403-14.
- Gambaryan S., Hauser, W., Kobsar, A., Glazova, M., and Walter, U. (2001) Distribution, cellular localization, and postnatal development of VASP and Mena expression in mouse tissues. *Histochem Cell Biol* 116, 535-543.
- Geal-Dor M., Freeman, S., Li, G., and Sohmer, H. (1993) Development of hearing in neonatal rats: air and bone conducted ABR thresholds. *Hear Res* 69, 236-42.
- Gertler F. B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J., and Soriano, P. (1996) Mena, a relative of VASP and *Drosophila Enabled*, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* 87, 227-39.
- Ginsberg M. H., Du, X., and Plow, E. F. (1992) Inside-out integrin signalling. *Curr Opin Cell Biol* 4, 766-71.
- Goh K. L., Cai, L., Cepko, C. L., and Gertler, F. B. (2002) Ena/VASP proteins regulate cortical neuronal positioning. *Curr Biol* 12, 565-9.
- Hafidi A., Despres, G., and Romand, R. (1990) Cochlear innervation in the developing rat: an immunocytochemical study of neurofilament and spectrin proteins. *J Comp Neurol* 300, 153-61.
- Halbrügge M. and Walter, U. (1989) Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem* 185, 41-50.
- Hauser W., Knobloch, K. P., Eigenthaler, M., Gambaryan, S., Krenn, V., Geiger, J., Glazova, M., Rohde, E., Horak, I., Walter, U., and Zimmer, M. (1999) Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8120-5.
- Hecox K. and Galambos, R. (1974) Brain stem auditory evoked responses in human infants and adults. *Arch Otolaryngol* 99, 30-3.
- Heneghan C. P., Thornton, C., Navaratnarajah, M., and Jones, J. G. (1987) Effect of isoflurane on the auditory evoked response in man. *Br J Anaesth* 59, 277-82.
- Henry K. R. and Haythorn, M. M. (1978) Effects of age and stimulus intensity of the far field auditory brain stem potentials in the laboratory mouse. *Dev Psychobiol* 11, 161-168.
- Holt M. R., Critchley, D. R., and Brindle, N. P. (1998) The focal adhesion phosphoprotein, VASP. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 307-11.
- Hynes R. O. and Lander, A. D. (1992) Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 68, 303-22.

- Iwasa H. and Potsic, W. P. (1982) Maturational change of early, middle, and late components of the auditory evoked responses in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg* 90, 95-102.
- Jewett D. L. and Romano, M. N. (1972) Neonatal development of auditory system potentials averaged from the scalp of rat and cat. *Brain Res* 36, 101-15.
- Jewett D. L. and Williston, J. S. (1971) Auditory-evoked far fields averaged from the scalp of humans. *Brain* 94, 681-696.
- Kang F., Laine, R. O., Bubb, M. R., Southwick, F. S., and Purich, D. L. (1997) Profilin interacts with the Gly-Pro-Pro-Pro-Pro sequences of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): implications for actin- based Listeria motility. *Biochemistry* 36, 8384-92.
- Kitamura K., Sakagami, M., Umemoto, M., Takeda, N., Doi, K., Kasugai, T., and Kitamura, Y. (1994) Strial dysfunction in a melanocyte deficient mutant rat (Ws/Ws rat). *Acta Otolaryngol* 114, 177-81.
- Klostermann A., Lutz, B., Gertler, F., and Behl, C. (2000) The orthologous human and murine semaphorin 6A-1 proteins (SEMA6A-1/Sema6A-1) bind to the enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like protein (EVL) via a novel carboxyl-terminal zyxin-like domain. *J.Biol.Chem.* 275, 39647-39653.
- Korey A. and Van Vactor, D. (2000) From the Growth Cone Surface to the Cytoskeleton: One Journey, Many Paths. *J Neurobiol* 44, 184-193.
- Kraus N., Smith, D. I., Reed, N. L., Willott, J., and Erwin, J. (1985) Auditory brainstem and middle latency responses in non-human primates. *Hear Res* 17, 219-26.
- Krugmann S., Jordens, I., Gevaert, K., Driessens, M., Vandekerckhove, J., and Hall, A. (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr.Biol.* 11, 1645-1655.
- Lambrechts A., Kwiatkowski, A. V., Lanier, L. M., Bear, J. E., Vandekerckhove, J., Ampe, C., and Gertler, F. B. (2000) cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains. *J Biol Chem* 275, 36143-51.
- Lanier L. M., Gates, M. A., Witke, W., Menzies, A. S., Wehman, A. M., Macklis, J. D., Kwiatkowski, D., Soriano, P., and Gertler, F. B. (1999) Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron* 22, 313-25.
- Lanier L. M. and Gertler, F. B. (2000) From Abl to actin: Abl tyrosine kinase and associated proteins in growth cone motility. *Curr.Opin.Neurobiol.* 10, 80-87.
- Laukli E. and Mair, I. W. (1981) Development of surface-recorded cochlear and early neural potentials in the cat. *Arch Otorhinolaryngol* 233, 1-12.

- Laukli E. and Mair, I. W. (1982) Development of early auditory-evoked responses in the cat: filter effects. *Audiology* 21, 350-8.
- Laurent C., Hellström, S., and Anniko, M. (1988) Inner ear effects of exogenous hyaluronan in the middle ear of the rat. *Acta Otolaryngol* 105, 273-80.
- Laurent V., Loisel, T. P., Harbeck, B., Wehman, A., Gröbe, L., Jockusch, B. M., Wehland, J., Gertler, F. B., and Carlier, M. F. (1999) Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 144, 1245-58.
- Lawrence D. W. and Pryzwansky, K. B. (2001) The vasodilator-stimulated phosphoprotein is regulated by cyclic GMP- dependent protein kinase during neutrophil spreading. *J Immunol* 166, 5550-6.
- Lebrand C., Dent, E. W., Strasser, G. A., Lanier, L. M., Krause, M., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., and Gertler, F. B. (2004) Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. *Neuron* 42, 37-49.
- Lefebvre P. P., Staecker, H., Weber, T., Van de Water, T. R., Rogister, B., and Moonen, G. (1991a) TGFSS1 modulates bFGF receptor message expression in cultured adult auditory neurons. *Neuroreport* 2, 305-8.
- Lefebvre P. P., Van de Water, T. R., Staecker, H., Weber, T., Galinovic-Schwartz, V., Moonen, G., and Ruben, R. J. (1992a) Nerve growth factor stimulates neurite regeneration but not survival of adult auditory neurons in vitro. *Acta Otolaryngol* 112, 288-93.
- Lefebvre P. P., Van de Water, T. R., Weber, T., Rogister, B., and Moonen, G. (1991b) Growth factor interactions in cultures of dissociated adult acoustic ganglia: neuronotrophic effects. *Brain Res* 567, 306-12.
- Lefebvre P. P., Weber, T., Rigo, J. M., Staecker, H., Moonen, G., and Van de Water, T. R. (1992b) Peripheral and central target-derived trophic factor(s) effects on auditory neurons. *Hear Res* 58, 185-92.
- Lidan D., Yedgar, S., Aronson, H. B., and Sohmer, H. (1992) Influence of experimentally elevated blood viscosity on the auditory nerve-brainstem evoked response and threshold. *Hear Res* 62, 57-62.
- Lin L. F., Mismar, D., Lile, J. D., Armes, L. G., Butler, E. T., III, Vannice, J. L., and Collins, F. (1989) Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* 246, 1023-1025.
- Liu H. M., Takagaki, K., and Schmid, K. (1988) In vitro nerve-growth-promoting activity of human plasma alpha 1-acid glycoprotein. *J Neurosci Res* 20, 64-72.

- Lloyd-Thomas A. R., Cole, P. V., and Prior, P. F. (1990) Quantitative EEG and brainstem auditory evoked potentials: comparison of isoflurane with halothane using the cerebral function analysing monitor. *Br J Anaesth* 65, 306-12.
- Low W., Dazert, S., Baird, A., and Ryan, A. F. (1996) Basic fibroblast growth factor (FGF-2) protects rat cochlear hair cells in organotypical culture from aminoglycoside injury. *J Cell Physiol* 167, 443-450.
- Luo L., Koutnouyan, H., Baird, A., and Ryan, A. F. (1993) Acidic and basic FGF mRNA expression in the adult and developing rat cochlea. *Hear Res* 69, 182-93.
- Luo L., Moore, J. K., Baird, A., and Ryan, A. F. (1995) Expression of acidic FGF mRNA in rat auditory brainstem during postnatal maturation. *Brain Res Dev Brain Res* 86, 24-34.
- Machesky L. M. and Insall, R. H. (1999) Signaling to actin dynamics. *J Cell Biol* 146, 267-72.
- Mair I. W., Elverland, H. H., and Laukli, E. (1978) Development of early auditory-evoked responses in the cat. *Audiology* 17, 469-88.
- Maisonpierre P. C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N. Y., Furth, M. E., Lindsay, R. M., and Yancopoulos, G. D. (1990) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247, 1446-1451.
- Meyer G. and Feldman, E. L. (2002) Signaling mechanisms that regulate actin-based motility processes in the nervous system. *Journal of Neurochemistry* 83, 490-503.
- Mlynski R., Brors, D., Aletsee, C., and Dazert, S. (2002) Histomorphometrische Bestimmung des Wachstumsverhaltens von Spiralganglienzellneuriten in vitro. *Laryngorhinootologie* 81, 184-8.
- Murofushi T., Kaga, K., and Asakage, T. (1994) Temporary latency shifts in auditory evoked potentials by injection of lidocaine in the rat. *Hear Res* 76, 53-9.
- Niebuhr K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U. D., Walter, U., Gertler, F. B., Wehland, J., and Chakraborty, T. (1997) A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *Embo J* 16, 5433-44.
- Nobili R., Mammano, F., and Ashmore, J. (1998) How well do we understand the cochlea? *Trends Neurosci.* 21, 159-167.
- Overbeck G. W. and Church, M. W. (1992) Effects of tone burst frequency and intensity on the auditory brainstem response (ABR) from albino and pigmented rats. *Hear Res* 59, 129-37.

- Paves H. and Saarma, M. (1997) Neurotrophins as in vitro growth cone guidance molecules for embryonic sensory neurons. *Cell Tissue Res* 290, 285-97.
- Pickles, J. O.: Physiology of hearing. In: Gleeson, M. (eds.), *Basic Science* 6, pp. 1-2/1-1/2/34, Butterworth/Heinemann, Oxford 1997.
- Pirvola U., Arumae, U., Moshnyakov, M., Palgi, J., Saarma, M., and Ylikoski, J. (1994) Coordinated expression and function of neurotrophins and their receptors in the rat inner ear during target innervation. *Hear Res* 75, 131-44.
- Pirvola U., Ylikoski, J., Palgi, J., Lehtonen, E., Arumae, U., and Saarma, M. (1992) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 mRNAs in the peripheral target fields of developing inner ear ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9915-9.
- Pistor S., Chakraborty, T., Walter, U., and Wehland, J. (1995) The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Curr Biol* 5, 517-25.
- Plantz R. G., Williston, J. S., and Jewett, D. L. (1981) Effects of undernutrition on development of far-field auditory brain stem responses in rat pups. *Brain Res* 213, 319-26.
- Probst, R.: Auditorisch Evozierte Potentiale (AEP). In: Probst, R., Grevers, G., and Iro, H. (eds.), *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde: ein sicherer Einstieg: kleine Etappen in Text, Bild und Ton* 1. Auflage, pp. 186-188, Thieme, Stuttgart 2000.
- Pukkila M., Zhai, S., Virkkala, J., Pirvola, U., and Ylikoski, J. (1997) The "toughening" phenomenon in rat's auditory organ. *Acta Otolaryngol Suppl* 529, 59-62.
- Ray D. C. and Drummond, G. B. (1991) Halothane hepatitis. *Br J Anaesth* 67, 84-99.
- Reichardt L. F. and Tomaselli, K. J. (1991) Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu Rev Neurosci* 14, 531-70.
- Reinhard M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B. M., and Walter, U. (1995) The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *Embo J* 14, 1583-9.
- Reinhard, M., Jarchau, T., Reinhard, K., and Walter, U.: VASP. In: Kreis, T. and Vale, R. (eds.), *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins*, pp. 88-92, Oxford University Press, Oxford, New York 1999.
- Reinhard M., Jarchau, T., and Walter, U. (2001) Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins. *Trends Biochem Sci* 26, 243-9.
- Represa J., Leon, Y., Miner, C., and Giraldez, F. (1991) The int-2 proto-oncogene is responsible for induction of the inner ear. *Nature* 353, 561-563.

- Represa J., Sanchez, A., Miner, C., Lewis, J., and Giraldez, F. (1990) Retinoic acid modulation of the early development of the inner ear is associated with the control of c-fos expression. *Development* 110, 1081-1090.
- Rose J. E., Sobkowicz, H. M., and Bereman, B. (1977) Growth in culture of the peripheral axons of the spiral neurons in response to displacement of the receptors. *J Neurocytol* 6, 49-70.
- Rottner K., Behrendt, B., Small, J. V., and Wehland, J. (1999) VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat.Cell Biol* 1, 321-322.
- Ruoslahti E. and Reed, J. C. (1994) Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 77, 477-8.
- Saha S. and Slepecky, N. B. (2000) Age-related changes in microtubules in the guinea pig organ of Corti. Tubulin isoform shifts with increasing age suggest changes in micromechanical properties of the sensory epithelium. *Cell Tissue Res* 300, 29-46.
- Salamy A. (1984) Maturation of the auditory brainstem response from birth through early childhood. *J Clin Neurophysiol* 1, 293-329.
- Salamy A. and McKean, C. M. (1976) Postnatal development of human brainstem potentials during the first year of life. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 40, 418-26.
- Schecterson L. C. and Bothwell, M. (1994) Neurotrophin and neurotrophin receptor mRNA expression in developing inner ear. *Hear Res* 73, 92-100.
- Schick B., Praetorius, M., Eigenthaler, M., Mack, A., Plinkert, P., Walter, U., Dazert, S., and Knipper, M. (2003) Expression of VASP and zyxin in cochlear pillar cells: indication for actin-based dynamics? *Cell Tissue Res* 311, 315-323.
- Schmidt C. E., Dai, J., Lauffenburger, D. A., Sheetz, M. P., and Horwitz, A. F. (1995) Integrin-cytoskeletal interactions in neuronal growth cones. *J Neurosci* 15, 3400-7.
- Schoenwaelder S. M. and Burridge, K. (1999) Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 11, 274-86.
- Sebel P. S., Ingram, D. A., Flynn, P. J., Rutherford, C. F., and Rogers, H. (1986) Evoked potentials during isoflurane anaesthesia. *Br J Anaesth* 58, 580-5.
- Sher A.E. (1971) The embryonic and postnatal development of the inner ear in the mouse. *Acta Otolaryngol Suppl* 285, 1-77.
- Shipley C., Buchwald, J. S., Norman, R., and Guthrie, D. (1980) Brain stem auditory evoked response development in the kitten. *Brain Res* 182, 313-26.

- Slepecky, N. B.: The Cochlea. In: Dallos, P., Popper, A. N., and Fay, R. R. (eds.), pp. 44-129, Springer-Verlag, 1996.
- Smith D. I. and Kraus, N. (1987) Postnatal development of the auditory brainstem response (ABR) in the unanesthetized gerbil. *Hear Res* 27, 157-64.
- Smolenski A., Poller, W., Walter, U., and Lohmann, S. M. (2000) Regulation of human endothelial cell focal adhesion sites and migration by cGMP-dependent protein kinase I. *J Biol Chem* 275, 25723-32.
- Sobkowicz, H. M.: The development of innervation in the organ of Corti. In: Romand, R. (eds.), *Development of auditory and vestibular systems 2*, pp. 59-100, Elsevier, Amsterdam 1992.
- Staecker H., Kopke, R., Malgrange, B., Lefebvre, P., and Van de Water, T. R. (1996) NT-3 and/or BDNF therapy prevents loss of auditory neurons following loss of hair cells. *Neuroreport* 7, 889-894.
- Staecker H., Liu, W., Hartnick, C., Lefebvre, P., Malgrange, B., Moonen, G., and Van de Water, T. R. (1995) NT-3 combined with CNTF promotes survival of neurons in modiolus-spiral ganglion explants. *Neuroreport* 6, 1533-1537.
- Starr A., Amlie, R. N., Martin, W. H., and Sanders, S. (1977) Development of auditory function in newborn infants revealed by auditory brainstem potentials. *Pediatrics* 60, 831-9.
- Stockard J. J., Sharbrough, F. W., and Tinker, J. A. (1978) Effects of hypothermia on the human brainstem auditory response. *Ann Neurol* 3, 368-70.
- Suter D. M. and Forscher, P. (2000) Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol* 44, 97-113.
- Suter D. M. and Forscher, P. (1998) An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Curr.Opin.Neurobiol* 8, 106-116.
- Tokimoto T., Osako, S., and Matsuura, S. (1977) Development of auditory evoked cortical and brain stem responses during the early postnatal period in the rat. *Osaka City Med J* 23, 141-53.
- Tolomeo, J. A. and Holley, M. C.: The function of the cytoskeleton in determining the mechanical properties of epithelial cells within the organ of Corti. In: Lewis, E. R., Long, G. R., Lyon, R. F., Narins, P. M., Steele, C. R., and Hecht-Poinar, E. (eds.), *Diversity in auditory mechanics*, pp. 556-562, World Scientific Publishing, River Edge, N.J. 1996.

- Trowell J., Peto, R., and Smith, A. C. (1975) Controlled trial of repeated halothane anaesthetics in patients with carcinoma of the uterine cervix treated with radium. *Lancet* 1, 821-4.
- Van de Water T. and Conley, E. (1982) Neural inductive message to the developing mammalian inner ear: contact mediated versus extracellular matrix interaction. *Anat.Rec.* 202, 195 A.
- Van de Water T. and Ruben, R. J. (1974) Growth of the inner ear in organ culture. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 83, 1-16.
- Van de Water T. R. and Ruben, R. J. (1971) Organ culture of the mammalian inner ear. *Acta Otolaryngol* 71, 303-12.
- Vasioukhin V., Bauer, C., Yin, M., and Fuchs, E. (2000) Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* 100, 209-219.
- Venstrom K. A. and Reichardt, L. F. (1993) Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *Faseb J* 7, 996-1003.
- Visconti R. P. and Hilfer, S. R. (2002) Perturbation of extracellular matrix prevents association of the otic primordium with the posterior rhombencephalon and inhibits subsequent invagination. *Dev Dyn* 223, 48-58.
- Walsh E. J., McGee, J., and Javel, E. (1986a) Development of auditory-evoked potentials in the cat. I. Onset of response and development of sensitivity. *J Acoust Soc Am* 79, 712-24.
- Walsh E. J., McGee, J., and Javel, E. (1986b) Development of auditory-evoked potentials in the cat. II. Wave latencies. *J Acoust Soc Am* 79, 725-44.
- Walsh E. J., McGee, J., and Javel, E. (1986c) Development of auditory-evoked potentials in the cat. III. Wave amplitudes. *J Acoust Soc Am* 79, 745-54.
- Weaver C. D., Yoshida, C. K., de Curtis, I., and Reichardt, L. F. (1995) Expression and in vitro function of beta 1-integrin laminin receptors in the developing avian ciliary ganglion. *J Neurosci* 15, 5275-85.
- Woolf N. K., Koehn, F. J., and Ryan, A. F. (1992) Immunohistochemical localization of fibronectin-like protein in the inner ear of the developing gerbil and rat. *Brain Res Dev.Brain Res* 65, 21-33.
- Wright R., Eade, O. E., Chisholm, M., Hawksley, M., Lloyd, B., Moles, T. M., Edwards, J. C., and MJ, G. A. (1975) Controlled prospective study of the effect on liver function of multiple exposures to halothane. *Lancet* 1, 817-20.

- Zhang H. L., Singer, R. H., and Bassell, G. J. (1999) Neurotrophin regulation of beta-actin mRNA and protein localization within growth cones. *J Cell Biol* 147, 59-70.
- Zheng J., Shen, W., He, D. Z., Long, K. B., Madison, L. D., and Dallos, P. (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405, 149-55.
- Zhou R., Assouline, J. G., Abbas, P. J., Messing, A., and Gantz, B. J. (1995) Anatomical and physiological measures of auditory system in mice with peripheral myelin deficiency. *Hear Res* 88, 87-97.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson Protein Tyrosinkinase
ABR	Hirnstammpotential früher Latenz ("auditory brainstem response")
AEP	Auditorisch evozierte Potentiale
Arp	Aktinfilament depolarisierender Faktor („actin-related-protein“)
BDNF	Wachstumsfaktor ("brain derives neurotrophic factor")
BERA	Hirnstammpotential früher Latenz ("brainstem evoked response audiometry")
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat ("cyclic AMP")
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat ("cyclic GMP")
dB SPL	Dezibel, Einheit für Schalldruckpegel
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	Extrazellular Matrix
EEG	Elektroencephalogram
ENA	Drosophila Ena/VASP- Familienmitglied enabled
EVH	Konservierte Ena/VASP-Domäne ("Ena/VASP-homology")
FAK	Fokale Adhäsionskinase ("focal adhesion kinasis")
F-Aktin	Filamentöses Aktin (Aktinfilament)
G-Aktin	Globuläres Aktin (monomere Form)
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor ("fibroblast growth factor")
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Mena	Ena/VASP-Familienmitglied

Anhang

NT-3	Neurotrophin Typ 3
NT-4/5	Neurotrophin Typ 4 und 5
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung ("phosphate buffered saline")
PRR	Prolin-reiche Region
Rho	Kleines Guanosin triphosphat (GTP) bindendes Protein
Robo	Roundabout, Protein zur Axon "Guidance"
SH3	Proteinbindungsdomäne ("Src-homology type 3")
Src	Familie von Protein-Tyrosinkinase
Trk	Tyrosinkinase
VASP	Vasodilatator-stimuliertes-Phosphoprotein
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
CP	„Capping Protein“
WW	Proteinbindungsdomäne
Ras	Onkogen ("oncogene that causes rat sarcoma")
MEK	Kinase der "mitogen aktiviert protein kinase" Familie
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase ("extracellular-regulated kinase")

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1-1: SCHEMATISCHE ABBILDUNG EINES QUERSCHNITTES DURCH DEN DUCTUS COCHLEARIS DER COCHLEA.....	3
ABBILDUNG 1-2: 3D-REKONSTRUKTION DER EVH1 DOMÄNE DER ENA/VASP HOMOLOGIE.	7
ABBILDUNG 1-3: VASP-DOMÄNEN UND IHRE BINDUNGSPARTNER.....	7
ABBILDUNG 1-4: ENA/VASP-PROTEINE KATALYSIEREN DIE VERLÄNGERUNG VON AKTINFILAMENTEN	9
ABBILDUNG 1-5: NACHWEIS VON VASP IN DER COCHLEA.	12
ABBILDUNG 2-1: VERSUCHSAUFBAU MIT NARKOSEEINHEIT UND BERA MESSVORRICHTUNG.	14
ABBILDUNG 2-2: VERSUCHSANORDNUNG DER ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN MESSUNGEN DES HÖRVERMÖGENS VON MÄUSEN.....	16
ABBILDUNG 2-3: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE MESSUNGEN EINER NOCH NICHT HÖRENDEN MAUS.	17
ABBILDUNG 2-4: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE MESSUNGEN EINER BIS 60 DB SPL HÖRENDE MAUS.....	18
ABBILDUNG 2-5: MEMBRANÖSE COCHLEA.	20
ABBILDUNG 2-6: VOM MODIOLUS ABGELÖSTES SPIRALGANGLION.....	20
ABBILDUNG 2-7: SPIRALGANGLIENZELLEXPANTATE MIT MAßSTAB.....	22
ABBILDUNG 2-8: VERMESSENES SPIRALGANGLIENZELLEXPANTAT.....	23
ABBILDUNG 3-1:HÖRENTWICKLUNG DER VERSUCHSTIERE IN DEN ERSTEN LEBENSWOCHEN.....	25
ABBILDUNG 3-2: NEURITENWACHSTUM VON SG-EXPLANTATEN AUF LAMININ, NT-3 UND UNTER NT-3-STIMULATION.....	27
ABBILDUNG 4-1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES WACHSTUMSKEGEL EINES AUSWACHSENDEN NEURITEN.	34

Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit entstand in der Klinik für Hals- Nasen- und Ohrenkranke der Universität Würzburg. Herrn Prof. Dr. med. J. Helms sei an dieser Stelle für die Benutzung der klinischen und wissenschaftlichen Einrichtungen der HNO-Klinik gedankt.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. S. Dazert möchte ich für die Überlassung des Themas und die jederzeit konstruktive Unterstützung danken.

Ebenfalls herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. U. Walter für die Übernahme der Zweitkorrektur und die hilfreichen Diskussionen.

Ein herzlicher Dank gebührt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Innenohrbiologie, für die hervorragende Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Hierbei sind besonders Dr. med. Christoph Aletsee, Dr. med. Dominik Brors, Dr. med. Robert Mlynski und Stefan Volkenstein, zu erwähnen. Ein ganz spezielles Dankeschön gilt Frau Petra Joa für die Hilfestellung während der gesamten Arbeit und ihre kompetente Unterstützung unter anderem bezüglich der Histochemie, den elektrophysiologischen Untersuchungen, den Fotoarbeiten sowie der Versorgung und Präparation der Tiere.

Weiterer Dank gebührt allen Mitarbeitern der HNO-Klinik, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Hierbei sei besonders Frau Priv.-Doz. Dr. med. W. E. Shehata-Dieler für die Hilfe bei der BERA-Auswertung und der Interpretation der audiologischen Daten gedankt. Weiter möchte ich Herrn H. Korder, für die Unterstützung bei den Photoarbeiten sowie der Bedienung der Soft- und Hardware und Herrn R. Keim für die Unterstützung bei Fragen zum BERA-Messcomputer und sonstiger EDV danken.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Walter und Priv.-Doz. Dr. med. M. Eigenthaler für die Überlassung der Tiere und die Unterstützung bezüglich meiner Fragen zu VASP. Frau Birgitta Schinke sei an dieser Stelle für Hilfestellungen bei der Versorgung der Tiere gedankt.

Danksagung

Weiterer Dank geht an Herrn Prof. A. F. Ryan, MD, PhD und seine Mitarbeiter für die Gastfreundschaft und Ausbildung in San Diego/USA.

Ebenso möchte ich Tobias Langenhan für die Durchsicht des Manuskripts danken.

Ein letztes großes Dankeschön geht an Marion, für ihre großartige Unterstützung.

René Hartensuer

Lebenslauf

Geburtstag und -ort: 03.09.1976, Wertheim/Main

Familienstand: ledig

Berufserfahrung

Wissenschaftlicher Mitarbeiter (10/2004 – aktuell)

Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,
Universitätsklinikum Münster

Arzt im Praktikum (07/2004 – 09/2004)

Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,
Universitätsklinikum Münster

Hochschulbildung

Studium der Humanmedizin (10/1997 – 05/2004)

Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Ärztliche Prüfung am 04.05.2004

Praktisches Jahr

Chirurgie, *Hôpital Cantonal Fribourg, Schweiz* (12/2003 – 03/2004)

Adult Medicine, *Tameside General Hospital, Ashton-under-Lyne, England*
(08/2003 – 12/2003)

Orthopaedics, *Bristol Royal Infirmary, University of Bristol, England*
(04/2003 – 08/2003)

Famulaturen

Pädiatrie, *Praxis Dr.med. Bruno Loda, Lauda-Königshofen* (08/2002 –
09/2002)

Traumatologie und Wiederherstellungschirurgie, *Charité, Humboldt
Universität Berlin* (03/2002 – 04/2002)

Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und Forschungsaufenthalt, University of California, San Diego, USA (08/2001 – 10/2001)

Anästhesie, Caritas Krankenhaus Bad Mergentheim (04/2001 – 05/2001)

Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Würzburg (02/2001 – 03/2001)

Allgemein- und Gefäßchirurgie, Städtisches Krankenhaus Wertheim/Main (03/2000 – 04/2000)

Zivildienst

Rettungsdienst Deutsches Rotes Kreuz (08/1996 – 08/1997)

DRK Tauberbischofsheim, Ausbildung zum Rettungssanitäter

Schulbildung

Technisches Gymnasium Bad Mergentheim (1993 – 1996)

Realschule Lauda-Königshofen (1987 – 1993)

Grundschule Lauda (1983 – 1987)

MÜNSTER, 17. OKTOBER 2004



RENÉ HARTENSUER